

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ VITAMINU C KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ V  
PLODECH JEDNOTLIVÝCH ODRŮD  
MÉNĚ ZNÁMÝCH DRUHŮ OVOCE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JITKA CETKOVSKÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ  
FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# STANOVENÍ VITAMINU C KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ V PLODECH JEDNOTLIVÝCH ODRŮD MÉNĚ ZNÁMÝCH DRUHŮ OVOCE

DETERMINATION OF C VITAMIN BY HPLC IN FRUITS OF INDIVIDUAL CULTIVARS  
OF LESS KNOWN KINDS OF FRUITS

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. JITKA CETKOVSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0222/2008</b>	Akademický rok: <b>2008/2009</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Jitka Cetkovská</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	<b>RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.</b>	
Konzultanti diplomové práce:	prof. Ing. Vojtěch Řezníček, CSc.	

### Název diplomové práce:

Stanovení vitamínu C kapalinovou chromatografií v plodech jednotlivých odrůd méně známých druhů ovoce

### Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- Popis a využití plodů vybraných druhů ovoce
- Přehled možných separačních systémů pro stanovení vitamínu C vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Experimentální část:

- Testování možných separačních systémů pro stanovení vitamínu C
- Úprava rostlinných matric pro analýzu
- Stanovení vitamínu C v plodech vybraných druhů ovoce

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Jitka Cetkovská  
Student(ka)

-----  
RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty



## ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o stanovení vitaminu C v různých odrůdách rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*, L.) a kdouloně obecné (*Cydonia oblonga*, Mill.). Teoretická část se zabývá obecnými informacemi o těchto méně známých druzích ovoce, jejich zdravotně významnými látkami a použitím. Jsou zde zmíněny i různé způsoby stanovení vitaminu C s důrazem na HPLC a extrakci vitaminu C z matrice.

V experimentální části byla testováním šesti kolon vybrána nejvhodnější (Gemini C18, 150 x 4,6 mm; 5 µm), na které byla provedena stanovení vitaminu C v různých odrůdách plodů kdouloně a rakytníku. Byly také zkoumány různé postupy úpravy vzorků pro analýzu a 2 různé separační systémy – systém s kyselinou šťavelovou a systém s fosfátovým pufrům a methanolem jako mobilní fází. Vitamin C byl stanovován jako kyselina askorbová.

## ABSTRACT

Diploma thesis deals with determination of vitamin C in various cultivars of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*, L.) and quince (*Cydonia oblonga*, Mill.). In theoretical part, there are mentioned basic information about these less known fruit species, their medically significant substances and utilization of these fruits. Various methods for determination of vitamin C are discussed with focus on HPLC and extraction of vitamin C from the matrix.

In experimental part, the most suitable column (Gemini C18, 150 x 4,6 mm; 5 µm) was chosen from six various columns. Analysis of vitamin C in various cultivars of quince and sea buckthorn fruits were carried out on this column. The various types of matrix preparation and two different separation systems (method with oxalic acid and system with phosphate buffer and methanol as a mobile phases) were investigated too. Vitamin C was determined as an ascorbic acid.

## KLÍČOVÁ SLOVA

vitamin C, rakytník řešetlákový, *Hippophae rhamnoides*, kdouloň obecná, *Cydonia oblonga*, HPLC

## KEYWORDS

vitamin C, sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides*, quince, *Cydonia oblonga*, HPLC



CETKOVSKÁ, J. *Stanovení vitaminu C kapalinovou chromatografií v plodech jednotlivých odrůd méně známých druhů ovoce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 87 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Touto cestou bych chtěla poděkovat především své vedoucí RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a připomínky, které mi poskytovala v průběhu řešení diplomové práce.*





# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Rakytník řešetlákový .....</b>	<b>14</b>
2.1.1	Informace o rostlině .....	14
2.1.2	Chemické látky obsažené v rakytníku .....	17
2.1.3	Pozitivní působení na lidský organismus .....	18
2.1.4	Využití rakytníku .....	19
2.1.5	Produkce .....	20
<b>2.2</b>	<b>Kdouloň obecná .....</b>	<b>22</b>
2.2.1	Informace o rostlině .....	22
2.2.2	Chemické látky obsažené v kdoulích .....	23
2.2.3	Využití .....	24
2.2.4	Produkce .....	25
<b>2.3</b>	<b>Vitamin C .....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Vitamin C – obecné informace .....	25
2.3.1.1	<i>Struktura vitamínu C a jeho role v lidském organismu .....</i>	<i>25</i>
2.3.1.2	<i>Fyziologie a výživa .....</i>	<i>26</i>
2.3.1.3	<i>Použití .....</i>	<i>27</i>
2.3.1.4	<i>Výskyt .....</i>	<i>27</i>
2.3.1.5	<i>Stabilita vitamínu C .....</i>	<i>28</i>
2.3.2	Reakce vitamínu C .....	29
2.3.2.1	<i>Askorbová kyselina .....</i>	<i>30</i>
2.3.2.2	<i>Dehydroaskorbová kyselina .....</i>	<i>32</i>
2.3.3	Vitamin C v rakytníku řešetlákovém .....	33
<b>2.4</b>	<b>Stanovení vitamínu C .....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Obecné principy, úvod .....	33
2.4.2	Extrakce a stabilita kyseliny askorbové .....	34
2.4.3	HPLC metody stanovení vitamínu C .....	35
2.4.3.1	<i>UV detekce .....</i>	<i>36</i>
2.4.3.2	<i>Fluorescenční detekce .....</i>	<i>37</i>
2.4.3.3	<i>Elektrochemická detekce .....</i>	<i>37</i>
<b>2.5</b>	<b>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Obecné informace o chromatografii .....	37
2.5.2	Kapalinová chromatografie .....	37
2.5.3	Instrumentace kapalinové chromatografie .....	39
<b>2.6</b>	<b>Výtěžnost stanovení .....</b>	<b>41</b>

<b>2.7</b>	<b>Parametry kolony.....</b>	<b>41</b>
2.7.1	Retenční charakteristiky.....	41
2.7.2	Účinnost a kvalita kolony.....	42
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Pomůcky.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Přístroje.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>Chemikálie .....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Testování možných separačních systémů pro stanovení vitamínu C.....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Příprava roztoků .....	43
	<i>Mobilní fáze – kyselina šťavelová.....</i>	<i>43</i>
	<i>Mobilní fáze – <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> : methanol (9:1).....</i>	<i>44</i>
3.4.2	Testování kolon .....	44
3.4.3	Srovnání metod pro stanovení vitamínu C v rakytníku .....	44
	3.4.3.1 <i>Obecný postup .....</i>	<i>45</i>
	3.4.3.2 <i>Výtěžnost.....</i>	<i>45</i>
<b>3.5</b>	<b>Úprava rostlinných matric pro analýzu .....</b>	<b>46</b>
3.5.1	Úprava kdoulí pro analýzu .....	46
	<i>Úprava strouháním.....</i>	<i>46</i>
	<i>Úprava mixováním.....</i>	<i>46</i>
3.5.2	Úprava rakytníků pro analýzu .....	46
	<i>Filtrace .....</i>	<i>46</i>
	<i>Extrakční činidlo.....</i>	<i>46</i>
	<i>Doba prodlení u extrakce.....</i>	<i>47</i>
	<i>Omezený přístup světla, tepla .....</i>	<i>47</i>
<b>3.6</b>	<b>Stanovení vitamínu C v plodech vybraných druhů ovoce pomocí HPLC.....</b>	<b>47</b>
3.6.1	Stanovení vitamínu C v plodech kdouloně.....	47
	<i>Kalibrační křivka .....</i>	<i>47</i>
	<i>Příprava vzorku pro analýzu .....</i>	<i>47</i>
3.6.2	Stanovení vitamínu C v plodech rakytníku .....	48
	<i>Kalibrační křivka .....</i>	<i>48</i>
	<i>Příprava vzorku pro analýzu .....</i>	<i>48</i>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Testování možných separačních systémů pro stanovení vitamínu C.....</b>	<b>49</b>
4.1.1	Testování kolon .....	49
	<i>Mobilní fáze – kyselina šťavelová.....</i>	<i>49</i>
	<i>Mobilní fáze – <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> : methanol (9:1).....</i>	<i>50</i>
4.1.2	Srovnání metod pro stanovení vitamínu C v rakytníku .....	51
	4.1.2.1 <i>Metoda 2.....</i>	<i>51</i>

4.1.2.2	<i>Metoda 3</i> .....	53
4.1.2.3	<i>Metoda 4</i> .....	55
4.1.2.4	<i>Výsledky srovnání čtyř metod</i> .....	56
4.1.2.5	<i>Výtěžnost</i> .....	57
<b>4.2</b>	<b>Úprava rostlinných matric pro analýzu</b> .....	<b>58</b>
4.2.1	Úprava kdoulí pro analýzu .....	58
4.2.2	Úprava rakytníků pro analýzu .....	58
	<i>Filtrace</i> .....	58
	<i>Extrakční činidlo</i> .....	58
	<i>Doba prodlení u extrakce</i> .....	58
	<i>Omezený přístup světla, tepla</i> .....	59
<b>4.3</b>	<b>Stanovení vitamínu C v plodech vybraných druhů ovoce</b> .....	<b>59</b>
4.3.1	Vitamin C v kdoulích .....	59
	<i>Sestrojení kalibrační závislosti</i> .....	59
	<i>Stanovení vitamínu C ve vybraných odrůdách plodů kdouloně</i> .....	60
4.3.2	Vitamin C v rakytníku řešetlákovém.....	62
	<i>Sestrojení kalibrační závislosti</i> .....	62
	<i>Stanovení vitamínu C ve vybraných odrůdách plodů rakytníku</i> .....	63
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ</b> .....	<b>71</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>72</b>
	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>73</b>



## 1 ÚVOD

Vyšlechtěním klasických druhů ovoce našeho podnebního pásma se trochu pozapomnělo na staré druhy ovoce, které byly dříve běžné. Mezi ně lze zařadit například kdouloň obecnou (*Cydonia oblonga*, Mill.), která podobně jako rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*, L.) pochází ze střední Asie. Tam byly oba tyto druhy hojně využívány ke konzumaci a k léčbě nejrozličnějších onemocnění.

Rakytník řešetlákový je v poslední době rostlinou zažívající rozmach. Hlavní využití nalézají jeho oranžové plody s vysokým obsahem vitamínu C,  $\beta$ -karotenu, vitamínu E, flavonoidů a nenasycených mastných kyselin. Především v prodejnách se zdravou výživou lze pořídit nejrozličnější přípravky z rakytníku od marmelád, šťáv, bonbónů, čajů, olejů až po nejrozličnější kosmetické přípravky. Výrobky bývají často připravovány z plodů, které zemědělci pěstovali v kontrolovaném ekologickém zemědělství. Produkci potravinářských výrobků z rakytníku se u nás zabývají především malé firmy a soukromníci. Větší společnosti se rakytníku věnují spíše v zahraničí.

Kdouloň je známá hlavně v teplejších regionech České republiky a v zahraničí, kde se pěstuje již dlouhou dobu jako ovocný strom a je pověstná svými aromatickými plody s vysokým obsahem pektinu. Plody se hodí především na další zpracování pro přípravu marmelád, kompotů a želé, protože samotná kdoule není příliš vhodná k přímé konzumaci.

Oba druhy méně známého ovoce obsahují zdravotně významné látky, které mohou přispět k léčbě nejrozličnějších onemocnění. U kdouloní jsou významné především látky fenolické povahy, které mají významné antioxidační schopnosti. V rakytníku se antioxidantů vyskytuje více, hlavně vzhledem k obsahu oleje. Co se týče množství vitamínu C, není kdoule tak bohatým zdrojem jako rakytník. Lze ji přirovnat obsahem spíše k jablkům a hruškám, kterým je také nejpodobnější.

Stanovení vitamínu C se zabývá v soudobé odborné literatuře mnoho prací. Převládá stanovení pomocí HPLC s reverzní fází a UV detekcí. V této práci byla hledána vhodná kolona pro stanovení vitamínu C. Mobilní fáze a extrakční činidlo bylo použito dle normy ČSN EN 14130 z roku 2004 [1].

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rakytník řešetlákový

#### 2.1.1 Informace o rostlině

##### *Historie a použití v tradiční medicíně*

První zmínky o rakytníku jsou dvanáct století staré. Používal se především v čínské, indické a tibetské medicíně, zmínky o něm nalezneme i ve starém Řecku. Používal se k léčení poškozené kůže, kašle, potíží s trávením a kardiovaskulárních onemocnění.

V druhé polovině 20. století bylo provedeno mnoho výzkumů na zvířatech a klinických studií pro stanovení fyziologických účinků rakytníku. Většina těchto publikací je v ruštině a čínštině. Část z nich ovšem nemůže být považována za vědecké studie.

V tradiční bylinné medicíně je rakytník dodnes využíván v Číně a Mongolsku k léčení nachlazení, zažívacích potíží, pro zlepšení krevního oběhu a zmírnění bolestí. Extrakty z větví a listů jsou účinné v léčbě zánětu tlustého střeva u zvířat a lidí. Listy pomáhají zmírňovat zažívací i dermatologické potíže a ve střední Asii se aplikují jako obklady při revmatické artritidě. Pro své hemostatické a protizánětlivé účinky se plody přidávají do receptů při plicních, gastrointestinálních, srdečních, krevních a metabolických poruchách v indické a tibetské medicíně. [2]



Obr. č. 1: Celá rostlina rakytníku řešetlákového [3]

### **Popis rostliny**

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*, L.) náleží do čeledi hlošínovitých (*Eleagnaceae*). Je to hustě větvený trnitý opadavý keř dosahující výšky 2–5 m. Větve mají šedou barvu a kopinaté listy a jsou oboustranně stříbřitě zelené.

Rostlina je dvoudomá a větrosnubná. Samčí květy jsou drobné a nahnědle stříbřité se dvěma rezavě žlutými okvětními lístky. Samičí květy mají žlutavou nebo zelenkavou barvu a jsou hustě pokryté hvězdíkovými šupinami. V úžlabí listů vyrůstá obvykle 3–5 květů.

Rakytník vykvétá na přelomu dubna a května až na dva týdny a už v první polovině května lze na samičích rostlinách pozorovat malé plody, které dozrávají většinou v září či říjnu. Plodem jsou nepravé peckovice, které mají v době zralosti žlutou, oranžovou až červenou barvu, oválný až vejčitý tvar a velikost nad 5 mm. K větvi jsou pevně přichyceny krátkou stopkou. Uvnitř plodu se nachází lesklé semeno skořicově hnědé barvy. Váha jednoho plodu se pohybuje v průměru kolem 0,38 g. Nástup do plodnosti bývá ve třetím roce po výsadbě. Dřevina je dlouhověká a může se dožít až 100 let. [2]



Obr. č. 2: Rakytník řešetlákový [4]

### **Stanoviště, areál rozšíření**

Rakytník můžeme najít v různě velkých skupinách od nížin až po větší nadmořské výšky. Roste na vlhkých až suchých světlých stanovištích, v sutích, písku a ve skalách, tedy v půdách lehčích, propustných a bohatých na vápník. Uspokojivě roste i na vlhkých nebo zasolených půdách. Snáší dobře výkyvy teplot, silný vítr i znečištěné ovzduší průmyslových oblastí.

Původním místem výskytu je střední Asie (Afgánistán, Uzbekistán a další), avšak nyní je rozšířen do značné části Evropy, Asie a Severní Ameriky. V Evropě se s ním můžeme setkat

především na mořském pobřeží nebo písčitých či písčitohlinitých březích řek a vodních nádrží. Roste od skandinávských fjordů až po přímořskou část Bulharska a značné plochy přirozených porostů lze nalézt na Sibiři, v Mongolsku, Číně, Turecku a jinde. Na našem území roste pouze druhotně. Poprvé byl v Čechách vysazen v roce 1835 v Královské oboře (Stromovce) v Praze. [2]

### ***Druhy, poddruhy, odrůdy***

Na počet druhů a poddruhů mezi odborníky nepanuje jednotný názor. Rakytíku se po celém světě vyskytuje přibližně 6 druhů a 12 poddruhů. Odrůd jednotlivých poddruhů je velké množství, zmíněny budou proto jen některé.

Mezi nejvýznamnější poddruhy (*subspecies*) rakytíku řešetlákového patří kromě poddruhu *Hippophae rhamnoides rhamnoides*, který se vyskytuje hlavně v Evropě, i čínský poddruh *sinensis* a mongolský a ruský poddruh *mongolica*. Poddruhy se liší jak vzhledem a velikostí plodů, tak i množstvím zdravotně významných látek. Z hlediska obsahu vitamínu C je nejvýznamnější čínský *sinensis*, kde hladiny vitamínu C dosahují úrovně až 2 500 mg ve 100 g plodů.

Mezi genotypy jsou zřetelné rozdíly, záleží však také na populaci a podmínkách prostředí. Při šlechtění se bere na zřetel hlavně vysoký obsah vitamínu C, vyšší množství cukru, snížený obsah tříslovin a také se pěstitelé snaží odstranit trny.

V České republice zatím nebyla vyšlechtěna vlastní odrůda, ale výtečně se zde daří některým ruským a německým odrůdám poddruhů *rhamnoides* a *mongolica*.

Mezi ruské odrůdy patří například:

- Dar Katuni, Masličnaja, Novost' Altaja, Vitaminaja, Zolotoj Počatok, Obilnaja, Oranževaja, Otradnaja, Podarok Sadu, Trofimovskaja.

K německým potom řadíme:

- Leicora, Hergo, Frugana, Pollmix (samčí). [2]



*Obr. č. 3: Plody rakytíku [5]*



## ***Pěstování, sběr plodů, sklizeň***

Pokud se plody nesebírají na podzim, mohou vydržet přes zimu až do dalšího roku. Proto je možné na větvích někdy vidět jak plody loňské, tak květy, či mladé plody letošní.

Nejčastější doba sklizně v evropských klimatických podmínkách se pohybuje od konce srpna do listopadu. Plody je lepší sbírat před úplným uzráním, jelikož se těžko trhají od větve a síla, vyvinutá k utrnutí, může zralý plod zničit. [2]

### **2.1.2 Chemické látky obsažené v rakytníku**

Mezi nejvýznamnější látky v rakytníku patří vitamíny C, E, karotenoidy, flavonoidy, minerální látky, organické kyseliny, volné aminokyseliny, cukry, mastné kyseliny, steroly, třísloviny. Obsah vitamínu C je vyšší než v jakémkoli jiném ovoci či zelenině. Množství chemických látek je závislé na době sběru plodů, na klimatu, odrůdě, oblasti, půdě, způsobu uchovávání a dalších faktorech.

Karotenoidy, vitamin E, vitamin C a flavonoidy patří k nejvýznamnějším antioxidantům v lidském organismu. Působí na potlačení rozvoje kardiovaskulárních chorob, na průběh diabetu, nádorových chorob, očních chorob spojených s věkem, Parkinsonovy choroby nebo revmatické artritidy.

**Karotenoidy** dávají plodům rakytníku jejich charakteristické žlutooranžové zbarvení. Nejvíce se jich nachází pochopitelně v nejbarevnější části rostliny – v dužině. Celkové množství karotenoidů ve 100 g čerstvých plodů je v rozmezí od 1 do 120 mg (z toho  $\beta$ -karoten 0,2–17 mg ve 100 g). Kromě  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -karotenu a lykopenu obsahuje rakytník ještě dihydroxy- $\beta$ -karoten, zeaxanthin,  $\beta$ -kryptoxanthin a kanthaxanthin.

Obsah **vitamínu E** v rakytníku se stejně jako u ostatních složek oleje liší v závislosti na původu oleje. Olej ze semen obsahuje 64,4–92,7 mg vitaminu E ve 100 g semen. V oleji ze šťávy je obsah 216 mg ve 100 g plodů a nejvíce vitaminu E lze nalézt v oleji z dužniny (481 mg ve 100 g plodů). Poměr zastoupení jednotlivých složek je následující:  $\alpha$ -tokoferol: 50 %,  $\beta$ -tokoferol: 40 %,  $\gamma$ -tokoferol: 10 %.

**Mastné kyseliny** jsou v rakytníku přirozenou součástí oleje. Jejich složení závisí na původu oleje – zda je ze semen či z dužniny. Semenný olej obsahuje osmnáctiuhlíkaté vysoce nenasycené mastné kyseliny (linolová, linolenová) asi ze 73 % a méně kyselinu olejovou (13 až 17 %). Olej z dužniny obsahuje více nasycených mastných kyselin o šestnácti uhlících. Z 38 % je zastoupena palmitová kyselina, z 14–50 % palmitoolejová kyselina a i zde se vyskytuje v menších množstvích kyselina olejová (12–33 %).

Nejvíce zastoupenou **minerální látkou** v rakytníku je draslík. Dále jsou přítomny prvky: sodík, vápník, hořčík, železo a fosfor. V daleko menší míře potom měď, zinek a mangan. Ve stopových množstvích můžeme v rakytníku nalézt například i hliník, arsen, chrom, nikl a další. Obsah všech prvků je však velmi závislý na odrůdách, přírodních podmínkách, klimatu a hlavně na složení vzduchu a půdy.

**Steroly** se v rakytníku vyskytují v nezmýdelnitelné frakci oleje. V semenech se nachází asi 0,1–0,2 % sterolů a v dužině 0,02–0,04 %. V oleji obsah sterolů připadá na 1 až 3 %, což odpovídá asi 350–500 mg/kg plodů. Největší zastoupení má sitosterol (60–70 % ze semenných sterolů), méně potom isofukosterol (10–20 %). Ve sterolech z dužniny má sitosterol asi 80 % zastoupení. Další steroly se vyskytují v množství 1–5 % z celkového obsahu sterolů. Patří sem kampesterol, stigmastanol, citrostadienol, avenasterol, cykloartenol a další.

Mezi nejvýznamnější **flavonoidy** v rakytníku patří isorhamnetin a kaempferol, v menší míře kvercetin. Celkový obsah rakytníkových flavonoidů se pohybuje od 415 do 765 mg v kg plodů, což je více než v běžném ovoci a zelenině. Studie prokázaly, že rakytník obsahuje monomerní gallokatechiny a nízkomolekulární oligomerní proanthokyanidiny.

**Anthokyanových pigmentů** je v rakytníku méně než v jiném ovoci, protože hlavní podíl na barvě plodů mají karotenoidy.

Mezi další fenolické látky v rakytníku můžeme zařadit **lignany**. Největší zastoupení má secoisolariciresinol a matairesinol. Nacházejí se jak v semenech, tak v dužnině v obsahu 51 až 319 µg ve 100 g suchých plodů.

Z **cukrů** obsahuje rakytník nejvíce glukosu a fruktosu, méně už cukerné alkoholy jako mannitol, sorbitol a xylitol.

Obsah **organických kyselin** se liší v závislosti na poddruhu. Nejvyšší hodnoty celkové kyselosti má čínský poddruh *sinensis* (3,5–9,1 g ve 100 ml). Největší podíl na kyselosti má kyselina jablečná, citronová a chinová. Během zrání se jejich koncentrace snižuje.

Rakytník obsahuje osmnáct **volných aminokyselin**, z nichž osm je esenciálních (threonin, valin, methionin, leucin, lysin, tryptofan, isoleucin, fenylalanin). Jejich význam je však zanedbatelný vzhledem k malému množství v jakém se běžně v potravinách vyskytují.

Z **těkavých látek** obsahuje rakytník estery s krátkým řetězcem (ethyl, 3-methyl butyl a cis-3-hexen-1-yl estery), větvené nebo n-mastné kyseliny a alkoholy. Obsah značně ovlivňuje datum sběru a genetické pozadí. [2]

### 2.1.3 Pozitivní působení na lidský organismus

Nejvýznamnější vlastností látek z rakytníku jsou **antioxidační účinky**. Antioxidanty slouží jako prevence proti volným radikálům a jejich reakcím, které normálně způsobují rakovinu a oxidační poškození mitochondriálních systémů. Surový extrakt z rakytníkových plodů obsahuje jak hydrofilní tak lipofilní antioxidanty a má vyšší inhibiční efekt na oxidaci lipidů.

**Antikarcinogenní účinky** má v rakytníku většina látek zmíněných v předchozí kapitole: vitamín C, karotenoidy, vitamin E, flavonoidy, esenciální nenasycené mastné kyseliny a fytosteroly.

Bylo prokázáno, že flavonoidy snižují produkci patogenních trombóz a redukují namáhání srdečního svalu regulací zánětlivých mediátorů. Také bylo prokázáno, že šťáva ovlivňuje hladinu plasma lipidů, zpomaluje oxidaci LDL cholesterolu a shlukování krevních destiček. Může tedy sloužit jako dobrý zdroj pro **léčbu hypertenze a onemocnění srdce**.

Rakytníkový olej normalizuje jaterní enzymy, **ochraňuje játra** před poškozením toxickými látkami (např. tetrachlormethanem). V kombinaci s antivirovými léky je vhodný jako doplněk při léčbě chronické hepatitidy B.

Olej rakytníku obsahuje mimo jiné palmitolejovou kyselinu, která se nachází i v lidské pokožce, což je považováno za základního činitele u **léčby popálenin a poranění pokožky**. Orálně podávaný vyživuje pokožku, napomáhá léčení popálenin, opařenin, vředů, atopické dermatitidy a ekzémů. Díky jeho schopnosti blokovat UV záření se přidává i do opalovacích krémů. Olej ze semen zvyšuje obsah  $\alpha$ -linolenové kyseliny v neutrálních lipidech. Dužninový olej zvyšuje obsah palmitolejové kyseliny. Olej také podporuje imunitní systém, zlepšuje cirkulaci krve v pokožce a napomáhá regeneraci tkání. Při působení na pokožku byl olej z dužniny nalezen účinnějším než olej ze semen.

Rakytník má i **protizánětlivé a antimikrobiální účinky**. Zmírňuje také krvácení dásní.

Na **imunitní systém** pozitivně působí především šťáva, která obsahuje ve vodě rozpustné antioxidanty – flavonoidy a vitamín C. [2]

#### 2.1.4 Využití rakytníku

Kromě potravinářských a lékařských účelů se rakytník využívá díky svému rozsáhlému kořenovému systému k rekultivaci náspů a hald. Schopnost snášet i značně znečištěné ovzduší poukazuje na možnost výsadby keře kolem komunikací. Jeho světlé tvrdé dřevo se využívá k tvorbě různých dekoračních předmětů a sám keř slouží i k ozdobě zahrad.

- **Šťáva**

Nejvýznamnější částí rostliny jsou oranžové plody, mající nakyslou chuť. Obsah vody se pohybuje dle poddruhu v rozmezí 60–80 %. Mezi nejčastější výrobky z rakytníku patří šťáva, olej ze semen a žlutý pigment. Fermentací plodů lze připravit i ocet.

Šťáva se získává nejčastěji lisováním umytých a vytríděných čerstvých plodů, dá se také připravit rozmixováním mražených plodů a následnou filtrací. Po chvíli stání se rozdělí na tři fáze: olejovou fázi na povrchu, uprostřed je čistá tekutina a ke dnu nádoby sedimentují tuhé částice dužniny, které se nejlépe odstraní filtrací, centrifugací nebo hydrolytickými enzymy (pektin methyl esterasa). Olejová vrstva ve šťávě ničemu zásadně nevádí, ale na každém povrchu, se kterým přijde do kontaktu, zanechá tenkou vrstvu, což může negativně ovlivnit spotřebitele, proto je lépe ji odstranit, např. centrifugací.

Průměrné pH šťávy se pohybuje okolo 3 a závisí na době sběru. Obsah titrovatelných kyselin je 1,97 % při přepočtu na kyselinu jablečnou. V suspendovaných částicích a oleji se vyskytují karotenoidy, které šťávě a plodům dávají žlutou barvu. Hlavním činitelem ovlivňujícím chuť šťávy je poměr obsahu cukrů a kyselin, který bývá ke konci sklizně vyšší (obsah cukrů je vyšší, než kyselin).

Složení šťávy se odvíjí od sloučenin, které jsou rozpustné ve vodě. Kromě nejvýznamnější látky – vitamínu C, obsahuje jednoduché cukry glukosu, fruktosu, xylosu i cukerné alkoholy jako mannitol, sorbitol a xylitol. Z organických kyselin převažuje kyselina jablečná a chinová, dále potom v menším množství kyseliny citronová, vinná a jantarová. Rakytníková šťáva obsahuje i spoustu minerálů. Mezi nejvýznamnější, co se týče obsahu, lze zařadit například draslík. Dále obsahuje volné aminokyseliny. Složení se liší původem, klimatem, teplotou, datem sběru a také metodou extrakce.

Pro skladování šťávy a plodů je třeba zajistit neoxidativní podmínky, tzn. eliminovat přístup vzduchu, světla a zajistit teplotu pod 4 °C (např. zmrazení v mikrotenových sáčkích). Pro lepší stabilitu je také možno šťávu konzervovat například cukrem, sorbanem draselným, kyselinou sorbovou či alkoholem nebo sterilovat, což ovšem sníží nutriční hodnotu potraviny.

Šťáva z rakytníku se využívá především k výrobě nápojů, sirupů, marmelád, želé, bonbonů, omáček a likérů.

- **Olej**

Olej z plodů rakytníku má různé složení podle toho, z které části plodu je získán: ze semene či z dužniny. Mezi nejvýznamnější látky obsažené v oleji patří karotenoidy, kterých se nachází nejvíce v dužnině, dále vitamín E a mastné kyseliny. Olej ze semen obsahuje více nenasycených mastných kyselin (kyselina linoleová a linolenová) než olej z dužniny (kyselina palmitová a palmitolejová). Obsahy ostatních komponent se také liší

v závislosti na původu oleje. Žluté a žlutooranžové plody mají vyšší obsah olejů než oranžové a oranžovočervené plody.

Pro izolaci olejů ze semen není moc vhodné lisování, kvůli vysoké ceně materiálu. Pro oddělení oleje od džusu se hodí centrifugace či dekantace. Neoptimálnější metodou se zdá být extrakce rozpouštědly (hexan, freon) či CO<sub>2</sub>-SFE.

Pro svou vlastnost absorbovat UVB záření nalézá uplatnění především v kosmetice jako složka přípravků na opalování. V kosmetickém průmyslu lze také využít antioxidačních vlastností (především tokoferoly) a schopnosti udržovat soudržnost tkáně a zabránit stárnutí kůže. Kromě krémů nabízí kosmetický průmysl i šampony, balzámy na rty, mýdla, olejíčky a další. Kvůli nízké viskozitě a světlé barvě může být použit v potravinářství do salátů a dresinků. Ze zdravotního hlediska jsou významné nenasycené mastné kyseliny, které mají antikarcinogenní účinky a pozitivně přispívají k léčbě kožních onemocnění, jako jsou ekzémy a popáleniny.

Lze jej přidávat do jídla nebo užívat jako doplněk stravy formou kapek a želatinových kapslí. V kosmetice slouží především k udržování zdravé pokožky a sliznice. Díky vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin, karotenoidů a tokoferolů nalézá využití v potravinářství především inkorporací do jogurtů apod.

Konzervace oleje je nejlepší mikroenkapsulací a skladováním v podobě prášku, jelikož se tak zabrání oxidaci nenasycených mastných kyselin.

- **Pigment, listy**

Z plodů rakytníku, jejich šťávy a semen se získává žlutý pigment. Nejčastější metodou izolace je extrakce nižšími alkoholy (např. ethanol) ovšem úspěšně byla provedena i superkritická CO<sub>2</sub> extrakce s následným vysušením až na žlutý prášek, který obsahuje převážně karoteny, flavonoidy a vitamin E. Je stabilní v kyselém a nestabilní v zásaditém prostředí. Degraduje se teplotami od 80–100 °C.

Při pokusech na myších nebyla prokázána toxicita pigmentu, proto jej lze využívat nejen jako přídatnou látku do potravin, ale i jako barvivo do farmaceutických a kosmetických prostředků.

Listy obsahují také karotenoidy, ovšem v nevýznamném množství. Mnohem významnější složkou listů jsou flavonoidy jejichž obsah se pohybuje mezi 319 a 2 100 mg ve 100 g vysušených listů, dále lze v listech najít volné a esterifikované steroly, triterpenoidy a isoprenoidy a tanniny.

Z listů se nejčastěji připravuje čaj, čajový prášek či extrakt z listů. Mohou se také využít jako krmivo pro hospodářská zvířata. Listy na čaj se sbírají v červnu a červenci ze samčích keřů.

V medicíně může najít uplatnění i dužnina stopky. [2]

### **2.1.5 Produkce**

Zatím jsou suroviny poměrně drahé, ale je v plánu snižovat ceny. Čína zatím zahrnuje 90 % světových zásob v podobě 1,4 milionu hektarů s výnosností přibližně 200 kg na hektar. Světová roční produkce se pohybuje kolem 28 000 t. Čína rozbíhá rozsáhlý ekologický program a aktivní výzkum pěstování různých odrůd. Rusko se po několik desetiletí věnuje selekci a kultivaci a i v Evropě lze zaznamenat zvyšující se trend v pěstování a průmyslovém použití. Pro snížení ceny je v plánu najít ideální techniku sběru plodů.

Na českém trhu se objevuje celá řada výrobků z rakytníku, např.:

- *Weleda*: Švýcarská firma vyrábějící rakytníkovou bio šťávu, bonbony a sirup a kosmetiku
- *Ekoplanet*: Turnovská společnost zabývající se ekologickým zemědělstvím a pěstováním rakytníku řešetlákového a výrobou produktů jako: neslazená šťáva, sirup a džem slazený fruktosou, medem a cukrem, sušená rakytníková šťáva s cukrem, tabletky, müsli tyčinky, ovocné plátky, čaje a oleje [2]
- *Zentiva*: Rakytníková indulona [6]
- *Ing. Pavel Cvrček*: Firma sídlící ve Lhotě pod Libčany (u Hradce Králové) zabývající se úpravou a zpracováním rakytníku: rakytníkový olej, šťáva, ovocná pomazánka, rakytník v medu, hojivý gel, kompot, sušený rakytník a další [7]
- *Natura Medica HK*: Společnost z Hradce Králové zabývající se výrobou olejového výluhu z rakytníku řešetlákového – *Gastrophaein* [8]



*Obr. č. 4: Rakytníková indulona [6]*



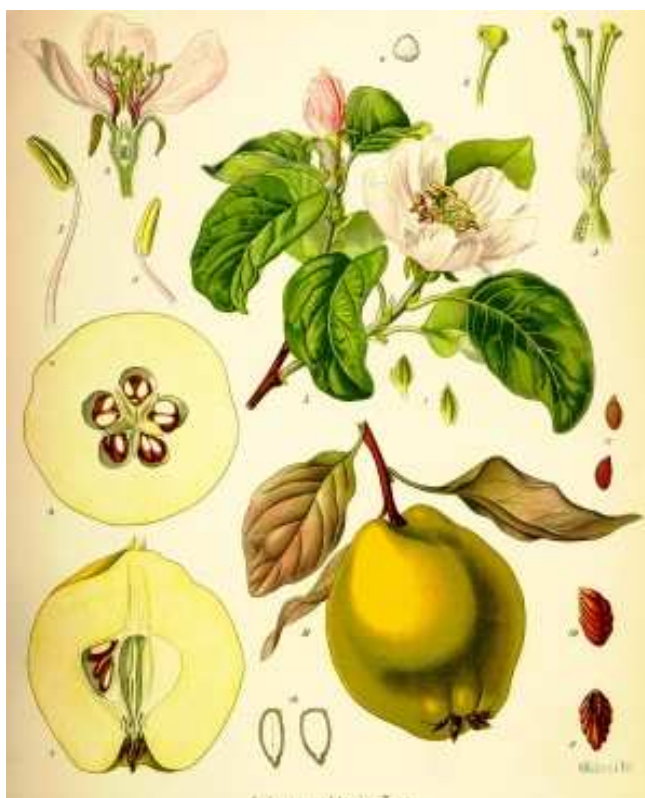
*Obr. č. 5: Rakytníkový sirup [9]*

## 2.2 Kdouloň obecná

### 2.2.1 Informace o rostlině

Kdouloň pochází ze střední Asie (Kavkaz, Írán až Indie) a postupně se stala oblíbenou ovocnou dřevinou ve všech zemích jižní Evropy. Pěstovala se již asi 4 000 let př.n.l. Ve starověku byly plody kdouloní považovány za symboly plodnosti o čemž svědčí i názvy: „zlatá jablka Hesperidek“ a „jablka Venušina“. Botanický název *Cydonia* dostala kdouloň od Římanů nejspíše proto, že ji dováželi ze Sydonu, *oblonga* znamená v latině podlouhlá. [10,11]

Kdouloň obecná (*Cydonia oblonga* MILL.) patří do rodu *Rosaceae*, podtřída *Maloideae* a vytváří až 8 metrů vysoký keřovitě rostoucí strom velmi dekorativního vzhledu s šedou kůrou a velkými celokrajnými listy.



Obr. č. 6: Kdouloň obecná [12]

Kvete koncem května a v červnu, tedy později než ostatní ovocné stromy, bílými až narůžovělými květy, vyrůstajícími na koncích jarních výhonků. Kdouloň je samosprašná a oboupohlavní, má schopnost vytvářet i partenokarpické plody (bez opylení) a některé zdroje uvádí i její hmyzosnubnost či větrosnubnost. Plod nazývaný kdoule je mnohosemenná, plstnatá a velmi aromatická malvice sytě žluté barvy a hruškovitého (Piriformis) nebo hrbolatě jablkovitého (Maliformis) tvaru. Průměrná hmotnost plodů standardních odrůd je mezi 180 a 400 g. Dužnina je tuhá a trpká. [10,13,11]

Kdouloň je rozšířena především v listnatých lesích při kaspické oblasti a i když jde o teplomilnou dřevinu, roste dobře a pravidelně plodí i v našich klimatických podmínkách. Vzrostlý keř poskytuje kolem 30 kg ovoce. Planě v ČR roste na Roudnicku a Brněnsku. [10,11,14]

Kdouloň obecná má dva poddruhy – subspecies *oblonga* a *integerrima*. Mezi odrůdy pěstované v České republice patří např.: Bereckého, Hemus, Champion, Vranja, Triumph, Leskovačka a další. [11]

Kvalitní ovoce lze získat pouze z ušlechtilých odrůd, které mají velké plody s jemnou dužninou. Kdouloň prakticky netrpí chorobami ani škůdci, jen v mimořádně vlhkém podzimu se může na plodech vyskytovat monilióza. Plody se sklízí až v pozdním podzimu – nejdříve začátkem října. I když ovoce vydrží v chladu i několik týdnů, je vhodné je po sklizni ihned zpracovat. [10]



Obr. č. 7: Kdoule (plod kdouloně obecné) [15]

### 2.2.2 Chemické látky obsažené v kdoulích

Kdoule se skládá z dužiny (91,6–96,9 % hmotnosti), jádřince se semeny (0,3–2,5 %) a slupky (2,9 %). Dužina obsahuje 82–86 hmotnostních procent vody. Ze sušiny zaujímají největší podíl sacharidy (124 až 153 g.kg<sup>-1</sup>) a vláknina (16 g.kg<sup>-1</sup>). Dále dužina obsahuje 1,2–1,8 % pektinu a 0,6 % taninů. [14,16]

Fruktosa je nejvýznamnějším **sacharidem**, méně kdoule obsahují glukosu a sacharosu [14]. Ve studii zabývající se složením semen byly v semenech kdoulí nalezeny glukany, galakto-glukany, mananno-glukany a arabino-xylan [17].

V zárodku semene se nachází 15 % oleje a v osemeni až 22 % slizu z větší části rozpustného ve studené vodě. Semena také obsahují jedovatý alkaloid amygdalin. [13,11]

Z **minerálních látek** jsou v plodech zastoupeny především fosfor, vápník, hořčík, železo a draslík [16].

Plody obsahují **vitaminy** A, B1, B2, B6, niacin, kyselinu listovou v malých stopách i biotin. Množství kyseliny askorbové se pohybuje většinou mezi 10 až 20 mg.100 g<sup>-1</sup>. [14,18]

Významnou skupinou zdravotně prospěšných látek – antioxidantů, jsou **fenolické látky**. Vyskytují se jak v dužině, slupce, tak i v semenech. Celkové množství fenolických látek v dužině bylo stanoveno na 20,8 mg a ve slupce 156,6 mg na 100 g plodů. Nejrozšířenější látkou je kaffeoylchinová kyselina, která v dužině zaujímá 97 % ze všech fenolických látek. Dále se v dužině vyskytují deriváty kvercetinu, rutin a polymerizované prokyanidiny. Ve slupce se vyskytuje navíc kaempferol a další blíže nespecifikované látky, ze 66 % se zde nachází flavony a největší podíl zaujímá rutin. Ve slupce je asi 8krát více fenolických sloučenin než v dužině. [19,18]



Dalšími látkami jsou **organické kyseliny**, jejichž celkový obsah byl ve 100 g dužniny a slupky stanoven na 700 mg. Největší zastoupení mají kyselina jablečná a chinová, které odpovídají 93 % všech kyselin v kdoulích. Mezi další organické kyseliny zastoupené už jen v malém množství patří kyseliny citronová, askorbová, fumarová, šikimová a šťavelová. [18]

V plodech bylo identifikováno 21 **volných aminokyselin** [20], ve slupce plodů bylo nalezeno větší množství volných aminokyselin než v dužnině (asi 1,6krát). Dužnina obsahuje 48 µg aminokyselin ve 100 g plodů a slupka 75,6 µg. Nejvíce zastoupeny jsou asparagová kyselina, glutamová kyselina, cystein, serin a hydroxyprolin, které odpovídaly asi 75 % celkového množství volných aminokyselin v dužnině a 85 % zaujímaly ve slupce. [18]

### 2.2.3 Využití

V herbářích z 16. a 17. století jsou kdouli připisované pozitivní účinky na průjem, ke zmírnění krvácení či k posílení žaludku a srdce [13]. Slizovitý nálev ze semene se v kosmetice využívá při léčení zánětů nebo k odstranění otoků. Osvědčuje se i při léčení oparů, popraskaných rtů, opruzenin a popálenin. [11]

Dozrálé plody se pro svou malou šťavnatost a trpkou a svíravou chuť nehodí k přímé konzumaci v neupraveném stavu, avšak jsou vhodné k přípravě kompotů a marmelád a zejména rosolů. Lze z nich připravit mošty, vína a hodí se i na sušení. V dřívějších dobách se z kdoulí vyrábělo chutné a trvanlivé cukrové pečivo s typickou a nenapodobitelnou vůní a příchutí. [10,11,14]

Sliz získaný ze semen lze také využít jako náhradu arabské gumy, přidává se do leštících přípravků. Kdouloňové listy obsahují 11 % taninů a mohou být použity k vydělávání kůže. [14]

V zahradnictví slouží kdouloň jako podnož k některým odrudám hrušní a hlohu. Lze ji využít také jako okrasný keř a její tvrdé dřevo je výborné na podpal. Plody dokážou krásně provonět místnosti. [11]



Obr. č. 8: Kdouloň obecná [21]



## 2.2.4 Produkce

Ve světě je kdoule velmi oblíbená, v roce 2004 byly vyprodukovány 378 200 t kdoulí, z toho v Evropě 52 500 t. V roce 2004 byly do ČR importovány pouze 4 t kdoulí. [14]

Na českém trhu se s výrobky z kdoulí lze setkat jen minimálně. Většinou se jedná o zahraniční produkty. Často se kdoulové aroma přidává například do parfémů.

Zde je výčet několika firem, jejichž výrobky lze v České republice pořídit:

- *Rudolf Jelínek*: Vizovická firma proslulá výrobou destilátů. Kdoule – ovocný destilát (kdoulovice). [22]
- *Oxalis*: Slušovická společnost zabývající se výrobou a distribucí výrobků z čaje a kávy. Kdoule slouží jako surovina pro výrobu ovocných čajů. [23]
- *B. J. Vitis*: Brněnská firma se zabývá výrobou produktů z hroznových jader a dalších surovin. Z kdoule je tradiční orleánskou metodou připravován Vitis Digestiv ocet Kdoule [24]
- *Logona*: Německá společnost vyrábějící biokosmetiku. Kdoule-aloe – oční gel [25]



Obr. č. 9: Ovocný destilát Kdoule [22]

## 2.3 Vitamin C

### 2.3.1 Vitamin C – obecné informace

#### 2.3.1.1 Struktura vitaminu C a jeho role v lidském organismu

Vitamin C strukturou můžeme zařadit mezi deriváty sacharidů – kyseliny [26]. Aktivitu vitaminu C má ze čtyř možných stereoisomerů kyseliny askorbové pouze L-askorbová kyselina ( $\gamma$ -lakton L-threo-hex-2-enonové kyseliny) [27]. Na C<sub>2</sub> a C<sub>3</sub> atomu má endiolové uspořádání, které jí dodává silné redukční účinky [27]. L-isoaskorbová kyselina, C-5 optický izomer a D-askorbová kyselina (C-4 optický izomer) se po chemické stránce chovají stejně jako kyselina askorbová (ascorbic acid, AA), ale tyto sloučeniny nemají biologickou aktivitu vitaminu C. L-isoaskorbová a L-askorbová kyselina jsou běžně používány jako potravinářská surovina pro jejich redukční a antioxidační aktivitu, ale isoaskorbová kyselina (D-askorbová kyselina) nemá žádnou nutriční hodnotu. [26] Vitaminem C se rozumí celý

reversibilní redoxní systém: kyselina L-askorbová, L-askorbylradikál a dehydroaskorbová kyselina (DHAA). První dvě sloučeniny se v roztocích o fyziologickém pH vyskytují jako anionty.

Úloha vitaminu C v lidském organismu spočívá především v hydroxylačních reakcích, jako jsou rozklad tyrosinu, vznik noradrenalinu, biosyntéza karnitinu a hydroxylace prolinu a lysinu v prokolagenu, kde je vitamin C kofaktorem enzymu prolylhydroxylasy a umožňuje zmíněnou hydroxylaci vznik síťované struktury kolagenu, která zajišťuje funkci vazivové tkáně. Vitamin C se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, má vliv na absorpci iontových forem železa a jeho transportu, stimuluje transport sodných, chloridových a zřejmě i vápenatých iontů a uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcí. [27,28]

Za jeho antioxidační vlastnosti jsou zodpovědné reakce s aktivními formami kyslíku (s volnými radikály) a reakce s oxidovanými formami vitaminu E. Zabezpečuje ochranu i pro labilní formy kyseliny listové [27]. Zpět je redukován donory elektronů, jako jsou glutathion, flavonoidy, tokoferol a NADPH [29]. Vitamin C inhibuje tvorbu nitrosaminů a je významnou antikarcinogenní a antimutagenní látkou [27]. Ochraňuje lipidy v plasmě a lipoproteiny o nízké hustotě před peroxidací vychytáváním peroxylových radikálů. Antioxidačně působí proti fotolyticky vytvořeným volným radikálům v čočce, rohovce, či na sítnici oka.

Objevují se i názory, že vitamin C může působit v těle jako prooxidant uvolňováním železa z ferritinu (především v poškozených tkáních), které je potom redukováno z železitých iontů na železnaté, jenž mohou katalyzovat reakce vedoucí ke vzniku hydroxylových radikálů, přispívajících k oxidačnímu poškození organismu. Avšak je pravděpodobné, že antioxidační vlastnosti askorbátu ve zdravém těle po většinu času převládají. [29]

### **2.3.1.2 Fyziologie a výživa**

Doporučovaný denní příjem pro ženy i muže je přibližně stejný a pohybuje se v rozmezí 60–200 mg a u oslabených jedinců mohou dávky i překračovat 1 g denně.

Kyselina askorbová je absorbována v trávicím traktu skrze aktivní přenašečový transport. Je přeměněna na dehydroaskorbovou kyselinu, která je přes buněčnou membránu přepravena rychleji a v buňkách epitelu se znovu redukuje na kyselinu askorbovou.

Veškerá potřeba vitaminu C je kryta z potravy (brambory, zelenina a ovoce). Nedostatek vitaminu C (hypovitaminosa) nemá specifické příznaky, často jsou pojmenovávány jako „jarní únava“ (únava, malátnost, ztráta chuti k jídlu, ospalost nebo naopak nespavost, nízká odolnost k infekcím a další). Nedostatek vitaminu po dlouhou dobu (avitaminosa) je známý pod názvem skorbut (kurděje), které se projevují krvácením dásní, ztrátou zubů, což způsobuje měknutí kolagenních struktur a rozsáhlé krvácení.

Antivitaminem C se rozumí řada oxidoreduktas (askorbát oxidasa, askorbátperoxidasa, superoxiddismutasa, atd...) Hladinu vitaminu C v těle také značně snižuje kouření. [27,29]

Mezi příznaky hypervitaminosy lze zařadit průjem nebo ledvinové kameny. [29]

Biologická dostupnost kyseliny askorbové ve vařené brokolici, částech pomeranče a pomerančových šťávách pro člověka je stejná jako v tabletách doplňků stravy. Využitelnost vitaminu C v syrové brokolici je o 20 % nižší než ve vařené. To může být způsobeno nedostatečným zpracováním potravy v ústech nebo jejím trávením. Relativně malý rozdíl ve využitelnosti kyseliny askorbové v syrové brokolici a potenciálně v dalších syrových zeleninách, vzhledem k jejich vařeným formám, mají jen malý nutriční význam. [26]

### 2.3.1.3 Použití

Vlastností kyseliny askorbové, jako např. antioxidantu či chelatačního činidla, se využívá především jako potravinářské aditivum (konzervářské a kvasné technologie, technologie masa, tuků a cereálií) s označením E 300. Antioxidační vlastnosti má také ve vodě rozpustná sůl natrium-askorbát (askorbát sodný) a lipofilní 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina, která také inhibuje tvorbu nitrosaminů v nakládaném masu a v masných výrobcích. Při nakládání masa kyselina askorbová redukuje dusičnany na dusitaný. Jako inhibitory tvorby nitrosaminů ji lze využít ve formě nepolárních acetalů, které jsou stabilnější než askorbyl-palmitát. Natrium-askorbát, podobně jako askorbyl-palmitát či askorbyl-fosfát jsou plně aktivní, na rozdíl od askorbyl-sulfátu, který je neaktivní formou vitamínu C. Avšak fosfát i sulfát jsou asi dvacetkrát stabilnější vůči oxidaci než volná kyselina. Stejnou biologickou aktivitou a stálostí vůči oxidaci se vyznačuje 2-O- $\alpha$ -D-glukosid. Isoaskorbová kyselina nemá přílišnou aktivitu vitamínu, avšak lze ji použít alespoň jako antioxidant.

Kyselina askorbová se přidává především k ovocným džusům a konzervovanému a mrazírensky skladovanému ovoci jako prevence nežádoucích změn aroma vyvolaných oxidací při skladování a zpracování. Používá se také jako inhibitor reakcí enzymového hnědnutí při loupání, krájení a sušení ovoce, zeleniny a brambor.

Přídavek askorbové kyseliny v množství 20–30 mg.kg<sup>-1</sup> je prevencí tvorby tzv. chladových a oxidačních zákalů piva a prevencí nežádoucích změn chuti a aroma v důsledku oxidace při pasteraci a skladování. Při technologii výroby vína umožňuje snížit dávky přidávaného oxidu siřičitého.

V masném průmyslu, např. při výrobě šunky přídavek kyseliny askorbové a dusitanů zkvalitňuje a urychluje výrobu – urychluje tvorbu charakteristického zbarvení masa ošetřeného dusitaný, zkracuje dobu uzení. Askorbová kyselina zvyšuje inhibiční účinku dusitanů na toxinogenní bakterie *Clostridium botulinum*.

10–100 mg.kg<sup>-1</sup> se přidává jako prostředek zlepšující pekařské vlastnosti mouky. Jako antioxidant tuků se používá askorbyl-palmitát v množství 0,006–0,040 %. [27]

Kyselina askorbová je velmi polární sloučenina a je proto v podstatě nerozpustná v tucích. Je však překvapivě účinná jako antioxidant, pokud je dispergována v olejnatých emulzích. Kombinace askorbové kyseliny a tokoferolu jsou velmi účinné v systémech lipidické povahy. Zatímco kombinace tokoferolu s lipofilním askorbyl-palmitátem je více efektivní v emulzích typu O/V. Podobně askorbyl-palmitát jeví synergický účinek tokoferolu a dalších fenolických antioxidantů. [26] Bioflavonoidy zvyšují hladinu askorbové kyseliny v různých živočišných orgánech tím, že ji buď chrání před oxidací katalyzovanou ionty kovů nebo zvyšuje její utilizaci v organismu. Přirozené zdroje askorbové kyseliny obsahující flavonoidy jsou proto účinnější než syntetický vitamin C. [27]

Průmyslově se vyrábí z glukosy hydrogenací až na cukerný alkohol D-sorbitol, ten je enzymově převeden specifickou oxidací na L-sorbosu použitím bakterie *Acetobacter ruboxydans*. Na atom C<sub>1</sub> diacetonového derivátu L-sorbosy se pak zavede karboxylová skupina a vzniklá diacen-2-oxogulonová kyselina zahříváním s HCl poskytuje kyselinu askorbovou. [27]

### 2.3.1.4 Výskyt

Vitamin C se vyskytuje především v potravinách rostlinného původu. V živočišných potravinách jsou nejvýznamnějším zdrojem játra [27]. Přirozeně se vyskytuje téměř výhradně v redukované formě – jako L-askorbová kyselina. Množství kyseliny dehydroaskorbové

v potravinách bývá téměř vždy nižší a je závislé na rychlosti oxidace askorbátu a hydrolýzy dehydroaskorbové kyseliny na 2,3-diketogulonovou kyselinu. [26] Obsah vitamínu C v potravinách rostlinného původu je závislý na vegetačních podmínkách během růstu, stupni zralosti, způsobu posklizňového zpracování a mnoha dalších faktorech.

Tabulka č.1: Obsah vitamínu C v některých potravinách [27]

<b>potravina</b>	<b>mg.100 g<sup>-1</sup></b>	<b>potravina</b>	<b>mg.100 g<sup>-1</sup></b>
jablka	1,5–5	mrkev	5–10
hrušky	2–4	paprika	62–300
černý rybíz	110–300	brambory	8–40
pomeranče	30–60	brokolice	110–113
šípky	250–1 000	křen	45–120
jahody	40–70	Petržel kadeř	150–270
kiwi	70–127	kapusta	70–140

Vitamin C člověk přijímá především v potravinách, kde jeho hladiny nejsou příliš vysoké, zato jich spotřebuje větší množství (např. brambory) [27].

### 2.3.1.5 Stabilita vitamínu C

Kyselina askorbová patří k jednomu z nejméně stabilních vitaminů. V nepřítomnosti vzdušného kyslíku jsou ztráty způsobeny především kyselinami katalyzovanou degradací. Celkové ztráty se pohybují zpravidla mezi 20 až 80 %.

Díky vysoké rozpustnosti kyseliny askorbové ve vodných roztocích dochází k největším ztrátám výluhem při mytí, blanšírování, vaření a konzervování ovoce a zeleniny. Rozsah ztrát závisí na pH, teplotě, množství vody, velikosti povrchu materiálu, zralosti, rozsahu kontaminace těžkými kovy a přívodu kyslíku. K značnému úbytku dochází rovněž loupáním plodů. Ke ztrátám dochází i při mléčném kvašení zeleniny.

Předcházení ztrátám vitamínu C obnáší:

- omezení kontaktu potravin se vzduchem (inertní atmosféra, kvašení, přidavek hydrogensířičitanů)
- snížení množství přítomných železitých a měďnatých iontů jejich vazbou do neaktivních komplexů chelatačními činidly
- vytváření nepříznivých podmínek pro vznik komplexů kovových iontů snížením aktivity vody, pH, použitím vhodných derivátů kyseliny askorbové,...

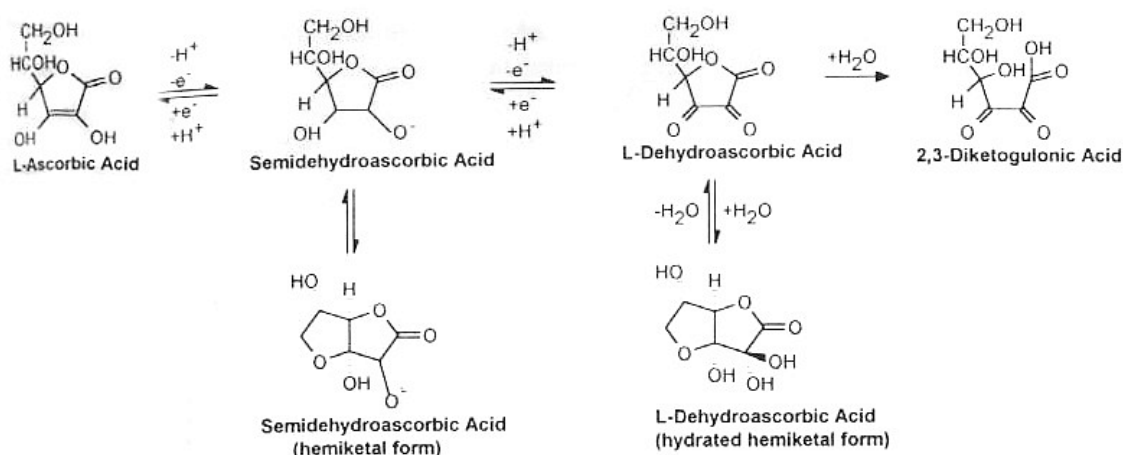
Stabilita askorbové kyseliny se odvíjí od hodnoty pH. Nejmenší ztráty jsou u ovoce, které má nižší pH. Pomocí vysokoteplotní krátkodobé sterilace lze zabránit větším ztrátám. K velkému úbytku vitamínu C dochází i při skladování potravin, např. kompotů.

Oxid siřičitý jako konzervační činidlo redukuje peroxid vodíku, čímž snižuje celkové ztráty vitamínu C u ovoce.

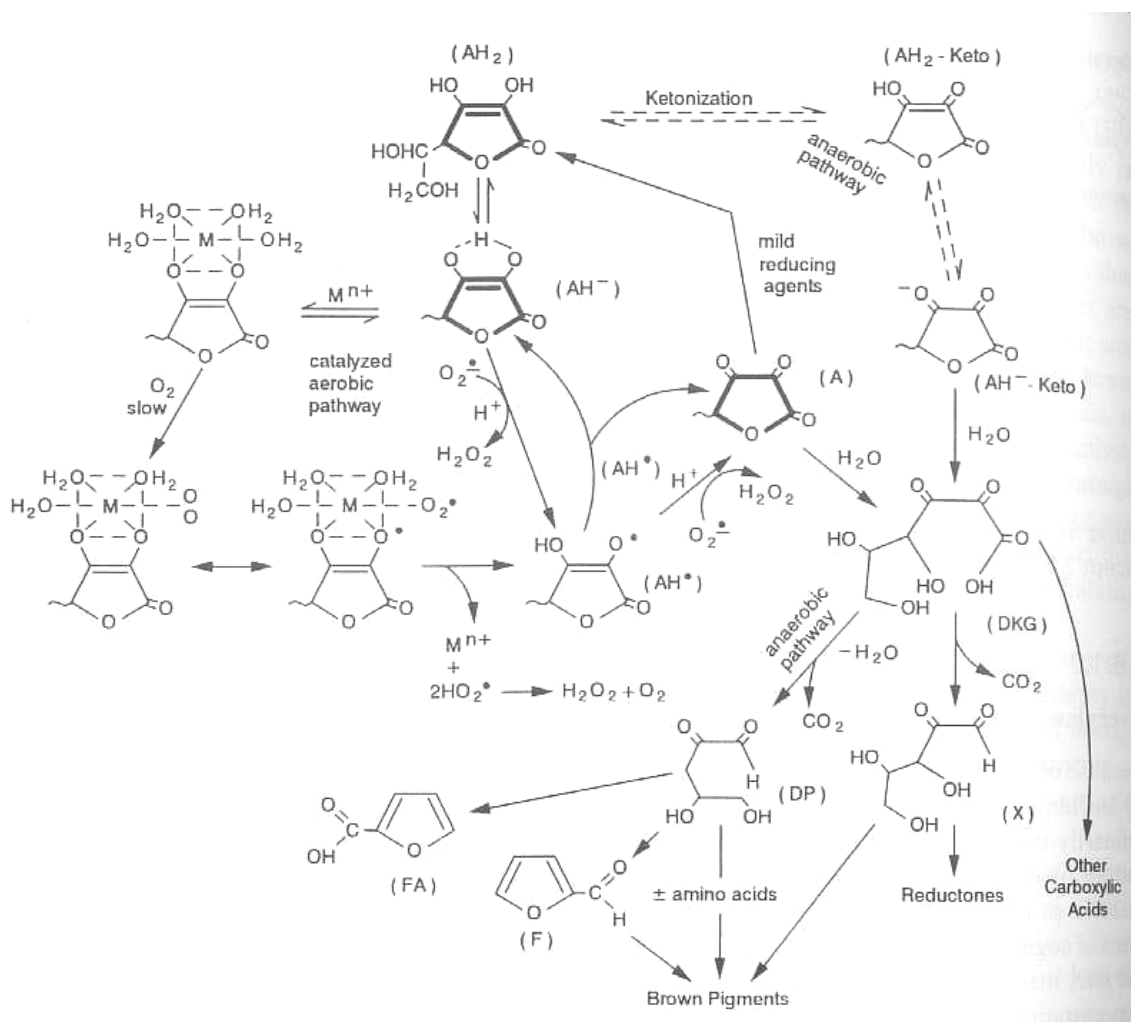
Nejstabilnější je vitamin C při zmrazování. Ovšem ke značným ztrátám může docházet při rozmrazování.

V mléce klesá obsah vitamínu C v závislosti na teplotě a době záhřevu při tepelném ošetření o 20–50 %. Mléko ošetřené technologií UHT má ztráty vitamínu nižší. [27]

## 2.3.2 Reakce vitaminu C



Obr. č. 10: Schéma postupné jedoelektronové oxidace L-askorbové kyseliny. Všechny produkty mají aktivitu vitaminu C, kromě 2,3-diketogulonové kyseliny. [26]



Obr. č. 11: Shrnutí mechanismu oxidační a anaerobní degradace askorbové kyseliny. Struktury se silnými čarami jsou primární zdroje aktivity vitaminu C. Poznámky:  $AH_2$  je plně protonovaná kyselina askorbová;  $AH^-$ , askorbátový monoanion;  $AH^*$  Askorbylradikál;  $A$ , dehydroaskorbová kyselina;  $FA$ , 2-furoic kyselina;  $F$ , 2-furaldehyd;  $DKG$ , diketogulonová kyselina;  $DP$ , 3-deoxypentosan;  $X$ , xylosan;  $Mn^+$ , kovový katalyzátor;  $HO_2^*$ , peroxylový radikál. [26].

Kyselina askorbová je kyselina dvojsytná, jelikož disociovat mohou obě enolové hydroxylové skupiny ( $pK_1 = 4,25$ ;  $pK_2 = 11,8$ ). V roztocích o fyziologickém pH se převážně vyskytuje jako anion. Jsou známy soli jen monovalentního anionu (např. natrium-askorbát).

Askorbylradikál je ve vodných roztocích přítomen jako anion stabilizovaný rezonancí ( $pK = -0,96$ ). Dehydroaskorbová kyselina existuje v roztoku jako hydratovaný bicyklický monomer. [27]

Chemická degradace primárně zahrnuje oxidaci na kyselinu dehydroaskorbovou, následovaná hydrolyzou na 2,3-diketogulonovou kyselinu a další oxidace, dehydratace, polymerizace a tvorba širokého množství dalších nutričně neaktivních produktů.

Druhy a koncentrace těchto produktů a mechanismus jejich vzniku jsou silně ovlivněny faktory jako je teplota, pH, aktivita vody, koncentrace kyslíku a kovových katalyzátorů a přítomnosti aktivních druhů kyslíku.

Jsou známy tři základní typy rozkladu produktů:

- polymerizované meziprodukty,
- nenasycené karboxylové kyseliny 5-C a 6-C,
- produkty rozpadu, které mají 5 a méně atomů uhlíku.

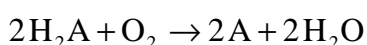
Při neutrálním pH během teplotní degradace askorbátu byl popsán také vznik formaldehydu. [26]

### 2.3.2.1 Askorbová kyselina

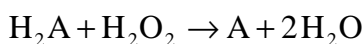
Kyselina askorbová je silně náchylná k oxidaci, kterou mohou katalyzovat kovové ionty, teplo, světlo vzdušný kyslík a různá chemická činidla. Rychlost reakce ovlivňují faktory jako pH, koncentrace kyslíku, aktivita vody a další. [26] Enzymovou oxidaci askorbové kyseliny způsobují tzv. antivitaminy C, enzymy, které ji oxidují až na dehydroaskorbovou kyselinu. Tato oxidace je vratná a probíhá různými mechanismy. Při jedoelektronové oxidaci vzniká jako meziprodukt radikál askorbové kyseliny a o dvoelektronové oxidaci hovoříme, jestliže vzniká přímo kyselina dehydroaskorbová.

#### • Enzymová oxidace

Mezi enzymy, které oxidují kyselinu askorbovou zvláště v mechanicky poškozených rostlinných pletivech patří hlavně askorbátoxidasa, popřípadě různé peroxidasy a další enzymy. Askorbátoxidasa působí na askorbovou kyselinu v přítomnosti vzdušného kyslíku.



Askorbátperoxidasa využívá jako akceptor protonů peroxid vodíku



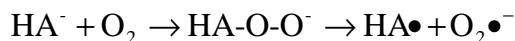
V obou případech je primárním produktem oxidace askorbové kyseliny askorbylradikál, resp. jeho anion stabilizovaný rezonancí. Je relativně inertní, nereaguje s kyslíkem, ale poměrně rychle tvoří ekvimolární směs askorbové a dehydroaskorbové kyseliny. Kyselina dehydroaskorbová může být opět redukována zpět na askorbovou kyselinu (např. glutathionem, cysteinem a jinými trioly, hydrochinony, atp...)

Ztráty vitamínu enzymovou oxidací v ovoci a zelenině při zpracování lze omezit účinným blanšírováním, které inaktivuje enzymy oxidující askorbovou kyselinu.

- **Autooxidace**

Autooxidace patří k nejvýznamnějším reakcím askorbové kyseliny. Jedná se o oxidaci vzdušným kyslíkem, která je původcem většiny ztrát v potravinách při jejich zpracování. Může probíhat i v přítomnosti iontů přechodných kovů, jako např. ionty trojmocného železa a dvojmocné mědi. V kyselém prostředí je reakce pomalá, se zvyšujícím pH se zrychluje.

Autooxidace bez katalýzy kovů probíhá podle rovnice:



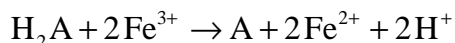
Anion kyseliny askorbové reaguje s tripletovým kyslíkem za vzniku přechodného produktu hydroperoxidu aniontu L-askorbové kyseliny, který se spontánně rozloží na superoxidový radikál a askorbylradikál, z kterého vzniká další reakcí anion.

Ionty kovů působí na průběh reakce katalyticky, jelikož kyselina askorbová tvoří s iontem kovu o vyšší valenci a s kyslíkem velmi stabilní ternární komplex, ve kterém je přítomna jako anion. V komplexu dochází k přenosu dvou elektronů z askorbové kyseliny na kyslík prostřednictvím iontu kovu. Po disociaci vzniká L-dehydroaskorbová kyselina, peroxid vodíku a dochází k regeneraci iontu kovu. Vzniklý peroxid vodíku může oxidovat další molekulu askorbové kyseliny a další oxylabilní složky potravin, nebo reaguje s železnatými ionty za vzniku hydroxylových iontů a radikálů. [27]

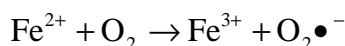
Schopnost kovových iontů katalyzovat degradaci askorbátu závisí na typu kovu, jeho oxidačním stavu a přítomnosti chelátů. Katalytická schopnost je v pořadí: Cu(II) je asi 80krát schopnější než Fe(III), a chelát s Fe(III) a EDTA komplex je asi 4krát lepší katalyzátor než volný Fe(III). [26]

- **Redukce iontů kovů**

Kyselina askorbová může především při nízkém pH a v malých koncentracích redukovat ionty kovů.



V důsledku této redukční působení urychluje oxidační reakce (vznik superoxidového, hydroxylového radikálu).



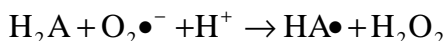
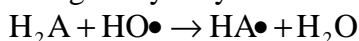
Při dostatečně vysoké koncentraci kyseliny askorbové dochází ke kompetitivní reakci s volnými radikály – kyselina askorbová se tedy v tomto případě uplatňuje jako antioxidant.

- **Reakce s volnými radikály**

Reakcí s volnými radikály kyselina askorbová i její izomery brzdí řetězovou autooxidační reakci a působí jako antioxidanty. Askorbová kyselina reaguje s peroxylovým a alkoxylovým radikálem za vzniku askorbylradikálu, který nevyvolává další reakce a disproportionuje na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu.

Antioxidační účinek kyseliny askorbové podtrhují tokoferoly, které potom přednostně reagují s volnými radikály lipidů. Vznikající radikály tokoferolů jsou na fázovém rozhraní tuk-voda redukovány askorbovou kyselinou zpět na tokoferoly.

Kyselina askorbová reaguje s hydroxylovým radikálem, anionem superoxidového radikálu či se singletovým kyslíkem.



- **Degradace katalyzovaná kyselinami**

V silně kyselém prostředí kyselina askorbová dekarboxyluje a dehydratuje za vzniku oxidu uhličitého a furan-2-karbaldehydu. Tato degradace bývá považována za hlavní příčinu ztrát vitamínu C v konzervárenství v nepřítomnosti vzdušného kyslíku. Při teplotě 50 °C ztrácejí ovocné džusy 70–95 % askorbové kyseliny během dvanácti týdnů skladování.

- **Reakce s dalšími složkami potravin**

Kyselina askorbová redukuje vznikající chinony při reakcích enzymového hnědnutí zpět na výchozí difenoly.

Rozkládá přebytečnou kyselinu dusitou přidávanou do masa při jeho nakládání, která je prekurzorem nitrosačních činidel.

Redukuje oxymyoglobin a metmyoglobin zpět na myoglobin. Stejně reaguje i hemoglobin. V přítomnosti askorbové kyseliny je tak k dispozici vyšší množství myoglobinu na reakci, kterou vzniká žádoucí barvivo nitroxymyoglobin.

Zabraňuje vazbě glutathionu na proteiny lepku za vzniku smíšeným disulfidů, které mají negativní účinky na pekařské vlastnosti mouky.

Karbanion askorbové kyseliny (C-2) reaguje s elektrofilními činidly – reaguje např. s degradačními produkty indolových glukosinolatů v brukvovitých zeleninách za vzniku askorbigenu, který je vůči oxidaci odolnější než askorbová kyselina a vykazuje antikarcinogenní účinky.

S aldehydy ve vodných roztocích tvoří poloacetal [27].

### **2.3.2.2 Dehydroaskorbová kyselina**

Dehydroaskorbová kyselina snadno hydrolyzuje a účastní se reakcí neenzymového hnědnutí, které pro svou nevratnost jsou důsledkem ztráty vitamínu C.

Nejstálější je dehydroaskorbová kyselina v roztocích o pH = 2,5–5,5 [27]. Stabilita DHAA při pH > 5,5 je velmi slabá a snižuje se se zvyšujícím se pH [26]. Hydrolýzou kyseliny za acidobazické katalýzy vzniká biologicky neaktivní 2,3-dioxogulonová kyselina, která je poměrně nestálá a jejím rozkladem vzniká mnoho dalších produktů. V kyselém prostředí vznikají deriváty furanu a v alkalickém prostředí organické kyseliny a dále tzv. reduktony. V širokém rozmezí hodnot pH probíhá dekarboxylace.

Reakcemi neenzymového hnědnutí dochází u poživatin s nízkou aktivitou vody a relativně vysokým obsahem vitamínu C. Dehydroaskorbová kyselina zde reaguje s aminy, aminokyselinami a bílkovinami za vzniku iminů (Schiffových bazí) a ty potom redukcí poskytují příslušné aminy nebo isomerací a eliminací aldehydů a oxidu uhličitého skorbamovou kyselinu (Streckerova degradace aminokyselin). Tento 2-aminoderivát poskytuje tzv. červený pigment, který s další molekulou skorbamové kyseliny tvoří tzv. žlutý pigment, z kterého následnými reakcemi vznikají hnědé polymerní pigmenty melanoidiny. [27]



### 2.3.3 Vitamin C v rakytníku řešetlákovém

Nejvíce zastoupenou zdravotně významnou látkou v rakytníku je vitamín C, jehož obsah v plodech se pohybuje v závislosti na poddruhu v rozmezí 30–2 500 mg ve 100 g, což je více, než v běžném ovoci a zelenině.

Z výzkumů vyplývá, že genetické pozadí je nejdůležitějším faktorem určujícím množství vitamínu C v plodech. Záleží také na populaci, avšak ne tak mnoho. Poddruh s největším obsahem vitamínu C je podle mnoha studií čínský *sinensis*, který obsahuje ve šťávě z dužniny 5–10krát více vitamínu C než ostatní poddruhy *ramnoides* a *mongolica*. Při porovnání velikosti plodů, obsahu šťávy a vitamínu C v jednotlivých poddruzích bylo zjištěno, že v *sinensis* se hladiny vitamínu C pohybují na asi  $8,4 \pm 2,4 \text{ g.l}^{-1}$  šťávy. Šťáva je v plodech zastoupena průměrně z 50–60 % a plody dosahují velikosti 3–8 mm. Evropský poddruh *ramnoides* obsahuje v průměru  $1,7 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$  vitamínu C. Ruský *mongolica* je na tom s obsahem vitamínu C nejhůře ( $0,5 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$ ), má však větší plody (6 až 16 mm) a větší množství šťávy v plodech (asi 70 %).

Dalšími faktory ovlivňujícími obsah vitamínu C v rakytníku je například doba sběru. Výzkumy bylo prokázáno, že od začátku září do konce listopadu se obsah vitamínu C pomalu snižuje.

Dle dalších výzkumů nebyl zjištěn žádný vztah mezi velikostí plodů a obsahu vitamínu C. Vliv na jeho obsah může mít však složení půdy i věk stromu.

Vitamin C je znám jako poměrně nestabilní látka, avšak průzkumy bylo zjištěno, že zmrazením plodů na  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  či zchlazením šťávy na  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  se obsah vitamínu C i rok výrazně nemění. Přesto je třeba k této skutečnosti přihlížet při výrobě nejrůznějších výrobků z rakytníku. [2]

## 2.4 Stanovení vitamínu C

### 2.4.1 Obecné principy, úvod

Existuje mnoho způsobů jak stanovit obsah vitamínu C v potravinách a výběr vhodné analytické metody je základem pro získání správných výsledků.

Celkové množství vitamínu C ve vzorku lze stanovit jako sumu množství kyseliny askorbové a dehydroaskorbové, která je také biologicky aktivní. Ke stanovení celkového vitamínu C se většinou používá konverze kyseliny dehydroaskorbové (DHAA) na kyselinu askorbovou (AA) pomocí vhodných redukčních činidel. [26]

Neustále se vyvíjejí nové metody především na simultánní stanovení těchto dvou kyselin, které je z důvodu jejich odlišných vlastností obtížné. Hlavními problémy jsou selektivita a citlivost metody, výběr interních standardů, retence AA a DHAA, výběr vhodného detektoru a stabilita kyselin v roztoku. [30]

Mezi tradiční analytické metody stanovení kyseliny askorbové patří redoxní titrace vzorku barvivem 2,6-dichlorfenolindofenolem, během které oxidace AA doprovází redukci redoxního barviva do bezbarvé formy. Nevýhodou tohoto stanovení je možný vliv dalších redukčních činidel, nedostatek odezvy DHAA a přítomnost chromoforů. Kyselinu dehydroaskorbovou lze stanovit po redukci plyným  $\text{H}_2\text{S}$  nebo použitím thiolových činidel a umožňuje stanovit celkové množství AA. Měření DHAA rozdílem však postrádá přesnost přímé analýzy.

Alternativní přístup zahrnuje kondenzaci dehydroaskorbové kyseliny různými karbonylovými činidly. Přímé působení fenyldrazinu tvoří spektrofotometricky

detekovatelný askorbyl-bis-fenylhydrazinový derivát umožňující jednoduché měření L-askorbové kyseliny v čistých roztocích. Mnohé karbonylové sloučeniny v potravinách však mohou interferovat s touto metodou. Podobný postup zahrnuje reakci kyseliny dehydroaskorbové s o-fenyldiaminem, který tvoří tricyklický silně fluoreskující kondenzační produkt. Přestože je specifitější a citlivější než fenylhydrazinová metoda, postup používající o-fenyldiamin může být také interferován různými dikarbonyly. V potravinách obsahujících isoaskorbovou kyselinu nemůže být stanovován vitamin C redoxní titrací nebo kondenzací s karbonylovými činidly, protože tyto metody probíhají i s těmito nutričně neaktivními sloučeninami.

Mnoho HPLC metod dovoluje přesné a citlivé stanovení celkového vitaminu C před a nebo po působení redukčního činidla, a určité metody dovolují přímé stanovení askorbové a dehydroaskorbové kyseliny. Spojení chromatografické separace se spektrometrickou, fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí dělá HPLC analýzu mnohem více specifitější než tradiční redoxní metody. HPLC metody umožňují simultánní stanovení kyseliny askorbové, isoaskorbové a stejně tak jejich dehydroforem. Metoda založená na GC-MS byla také zaznamenána, ale velkou její nevýhodou je rozsáhlá příprava vzorků. [26] Metoda HPLC se pro stanovení vitaminu C zdá být vhodnější zejména z hlediska, že nedochází ke ztrátám stanovované látky při vysokých teplotách, kterých se dosahuje u plynové chromatografie. Bylo prokázáno, že plynová chromatografie zobrazuje obsah vitaminu C o 10–20 % menší, než HPLC analýza. Další nevýhodou je, že vitamin C může být detekován v plynové chromatografii pouze jako kyselina askorbová.[2,31]

#### **2.4.2 Extrakce a stabilita kyseliny askorbové**

Kyselina askorbová je rozpustná ve vodě, omezeně rozpustná v acetonitrilu, kyselině octové a v alkoholech s krátkým řetězcem jako je methanol a ethanol. Je nerozpustná v etheru, chloroformu, benzenu, petroletheru, v olejích a tucích.

Největší ztráty vitaminu C v ovoci a zelenině způsobují především endogenní oxidační enzymy jako askorbát oxidasa nebo askorbát peroxidasa. [32] Další faktory jsou světlo, teplota, nasycení kyslíkem a přítomnost kovů. [30]

Vitamin C patří k nejméně stabilním vitaminům, proto se při jeho stanovení často dává velký důraz na extrakční podmínky a skladování roztoků.

Extrakce vitaminu C musí probíhat tak, aby se co nejvíce zamezilo degradaci a ztrátám vitaminu. S ohledem na dobrou stabilitu vitaminu C v roztocích s nízkým pH je častým postupem extrakce kyselinou, která chrání vitamin C před oxidací a hydrolýzou, zatímco sráží protein, který je často asociován s endogenním vitaminem C v potravinách. [33] Obecně pH okolo 2,1 zajišťuje dobrou stabilitu a výtěžnost extrakce kyseliny askorbové. Mezi nejpoužívanější extrakční činidla lze zařadit kyselinu metafosforečnou, trichloroctovou nebo šťavelovou, popřípadě lze použít směsi jako alkoholy s krátkým řetězcem (methanol, ethanol) a jako antioxidanty lze užít EDTA, diethylenetriaminpentaoctovou kyselinu, trichloroctovou, orthofosforečnou kyselinu, homocystein, dithiotreitol, glutathion, L-cystein a další. [30]

Zamezení přístupu vzduchu lze řešit probubláváním inertními plyny [33]. Extrakce se také nejčastěji provádí při nízkých teplotách používáním vychlazených roztoků a poměrně vhodnou se zdá být i extrakce na ledu [34]. Expozice světlu by měla být rovněž co nejnižší, čemuž lze zabránit například používáním tmavého skla [33,30].

Kinetika rozpadu kyseliny askorbové je popsána a experimentálně dokázána jako reakce prvního řádu [35]. Při studii kinetiky vitamínu C v semenech hrachu byl zaznamenán pokles na 91,6 % původní hodnoty po roce skladování při teplotě -18 °C. [32] V další studii byl pokles vitamínu C sledován v džusech při 18, 28 a 38 °C po dobu 0, 2, 4 a 6 měsíců. Po 6 měsících byl úbytek 21, 31 a 81 %. [36]

Na extrakci vitamínu C ze zelených fazolí byly zkoušeny různé postupy. Trichloroctová kyselina o koncentraci 0,3 M nezajistila dostatečnou extrakci vitamínu ze vzorku, u dalšího extrakčního činidla (0,05% EDTA v 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) byly zjištěny interference EDTA. Byl také testován 3 % roztok kyseliny metafosforečné v 8 % kyselině octové, ale nakonec byl vybrán 4,5 % roztok kyseliny metafosforečné i když oba roztoky s kyselinou metafosforečnou poskytovaly na chromatogramu dobré výsledky. [37]

Na jedné straně je kyselina metafosforečná (monohydrogenfosforečná) jedním z nejlepších extrakčních činidel kyseliny askorbové v porovnání s citronovou, octovou, chloristou a orthofosforečnou kyselinou, na druhé straně může způsobovat tato kyselina vážné analytické interakce se stacionárními fázemi na bázi silikagelu, např. C<sub>18</sub> nebo NH<sub>2</sub> kolony. Tyto interakce mohou způsobovat posuny v základní linii a retenčním čase. Kyselina metafosforečná o koncentraci 5 % stabilizuje kyselinu askorbovou během dvouměsíčního skladování při -20 °C. [38]

Základní podmínkou při extrakci je inaktivace degradačních enzymů, které mohou během extrakce snížit obsah kyseliny askorbové a je třeba rovněž zajistit stabilitu AA/DHAA redoxní rovnováhy. Kyselina askorbová podléhá ochotně oxidaci za alkalických podmínek, proto je vhodná extrakce kyselinou k potlačení metabolické aktivity enzymů těsně po rozrušení buněk a je vhodná i k srážení proteinů. Dostatečnou extrakci zajišťuje metafosforečná kyselina. Kyselinu šťavelovou lze také použít jako extrakční činidlo, je levnější a méně toxická než metafosforečná kyselina, avšak někdy neposkytuje dostatečnou výtěžnost veškeré kyseliny askorbové přítomné ve vzorku a extrakty jsou méně stabilní než v metafosforečné kyselině. Experimenty bylo zjištěno, že extrakty tropického ovoce v roztoku metafosforečné kyseliny jsou čistější než v kyselině šťavelové. HPLC analýzou množství vitamínu C v testovaných extrakčních činidlech byl pozorován statisticky významný rozdíl. V několika vzorcích byla kyselina šťavelová zhodnocena jako nevhodné extrakční činidlo z důvodu nízkého parametru výtěžnosti. [39]

V plodech růže šípkové bylo stanoveno množství vitamínu C za různých extrakčních podmínek. Byla testována především teplota. Podle testu výtěžnosti bylo dokázáno, že metoda za chladu (4 °C) je spolehlivější než metoda za laboratorní teploty. Obě metody byly prováděny s ochranou před světlem. [40]

V příloze č. 4 je uveden stručný přehled několika způsobů extrakce vitamínu C z různých matic. Byly vybrány práce zabývající se HPLC metodami stanovení vitamínu C v potravinách, popřípadě jiných biologických materiálech. Největší důraz byl kladen na analýzu s UV detekcí.

#### 2.4.3 HPLC metody stanovení vitamínu C

Kyselina askorbová a dehydroaskorbová patří do skupiny velmi malých polárních molekul, které je těžké zadržet v běžném chromatografickém systému s reverzní fází a oddělit je od mrtvého objemu.

U **HPLC-RP** se používají nejčastěji mobilní fáze s velkou převahou vody a s částí anorganické nebo organické kyseliny nebo anorganického pufru. Tyto mobilní fáze mívají často nízké pH, což může urychlit degradaci kolon na bázi silikagelu.

**Iontopárová** chromatografie není pro stanovení vitaminu C příliš vhodná. Mobilní fáze bývají často velmi komplexní a obsahují anorganické látky, které se mohou ve formě solí usazovat v některých částech systému. Tato modifikace HPLC nemá také příliš dobrou opakovatelnost a selektivitu.

**Iontovýměnná** chromatografie využívá skutečnosti, že kyselina askorbová je slabá organická kyselina a může být tedy zachycena silným aniontovým měničem. Objevily se i metody s amino-modifikovanou stacionární fází. Jako mobilní fáze byl použit anorganický pufr nebo kyselina při nízkém pH.

Chromatografie **s iontovou výlukou** (ion-exclusion) má stacionární fázi na bázi sulfonovaných sférických PS/DVB pryskyřic v různé iontové formě. Mobilní fází bývá často anorganická kyselina (sírová, fosforečná, siřičitá...). Retence na těchto kolonách je kontrolována elektrostatickými odpuzivými silami, hydrofóbními interakcemi a efektem iontové výluky. Funkční sulfoskupina na stacionární fázi odpuzuje ionty se stejným nábojem elektrostatickou silou a zamezuje jim vnikat do porézního systému. Silně ionizované roztoky jsou vylučovány ze systému pórů. Neutrální roztoky nejsou ovlivňovány elektrostatickými silami a vstupují do pórů a rozštěpují se v důsledku hydrofobních interakcí. Slabě ionizované roztoky (organické kyseliny s AA a DHAA) jsou eluovány někde mezi, v důsledku elektrostatických sil a parciální penetrace do pórů, kde se objevují hydrofobní interakce. Retence je také ovlivňována velikostí molekul. Stacionární fáze je odolná vůči velmi kyselým roztokům. Metoda se zdá být vhodná k stanovení vitaminu C.

**HILIC** (kapalinová chromatografie založená na hydrofilních interakcích) je alternativa k RP-HPLC a je vhodná k analýze malých polárních molekul slabě zadržovaných nebo vymývaných s mrtvým objemem konvenčních RP-HPLC systémů. Retence analytu je zde vysvětlována rozdělením analytu mezi vodou obohacenou vrstvou nehybného eluentu na hydrofilní stacionární fázi. Relativně hydrofobním hlavním eluentem s hlavními komponenty bývá zpravidla 5–40 % vody v acetonitrilu. Eluce je zajištěna zvyšováním polarity mobilní fáze, tudíž obsahu vodní fáze. [30]

Příloha č. 5 ukazuje výčet nejružnějších HPLC metod pro stanovení vitaminu C v potravinách popřípadě jiných biologických vzorcích z literatury za posledních 10 let.

#### 2.4.3.1 UV detekce

Detekce jednotlivých složek vitaminu C je komplikovaná kvůli jejich odlišným vlastnostem [33]. Kyselina askorbová absorbuje UV záření silně při 254 nm (245–265 nm v závislosti na pH), avšak přímou spektrofotometrickou analýzu znemožňuje často přítomnost dalších chromoforů v potravinách [26]. Kyselina dehydroaskorbová absorbuje dobře při 185 nm avšak nad 220 nm je absorbance slabá [41].

Pro simultánní stanovení obou kyselin je třeba redukovat kyselinu dehydroaskorbovou na askorbovou. První krok zahrnuje stanovení samotné kyseliny askorbové, následně je proveden redukční krok a je stanoveno celkové množství vitaminu C. Množství kyseliny dehydroaskorbové lze potom vypočítat odečtením hladiny AA od celkového množství vitaminu C. Konverze DHAA na AA se nejčastěji provádí pomocí dithiothreitolu (DTT), popřípadě TCEP (*tris*(2-karboxyethyl)phosphine) či L-cysteinu. [30]

#### 2.4.3.2 Fluorescenční detekce

Obě kyseliny nejsou přirozeně fluorescenční avšak DHAA reakcí s o-fenyldiaminem vytváří fluorescentní chinoxalinový derivát 3-(1,2-dihydroxyethyl)furo[3,4-b]chinoxalin-1-on [33]. Derivatizace může být pre- nebo postkolonová. Detekce derivátu je provedena excitací při 355 nm a emisí při 425 nm.

Simultánní stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové může být provedeno duálním detekčním systémem, kde AA je detektována pomocí UV detektoru a DHAA fluorescenčně. [30]

Pokud není k dispozici duální systém, musí být kyselina askorbová oxidována např. reakcí kyseliny askorbové s peroxylovými radikály generovanými *in situ* termální dekompozicí azosloučeniny 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochloridem (AAPH) na kyselinu dehydroaskorbovou. Ta zkondenzuje s benzen-1,2-diaminem na vysoce fluorescenční chinoxalinový derivát. [42]

#### 2.4.3.3 Elektrochemická detekce

Kyselinu askorbovou lze detekovat elektrochemicky, kdežto kyselina dehydroaskorbová je elektrochemicky inaktivní. [33] Tento způsob detekce má vysokou citlivost, specifitu a zvolením optimálního napětí obou elektrod lze dosáhnout redukce interferujících sloučenin zkoumané matrice. Nevýhodou je dlouho trvající ekvilibrace kolony a vysoké požadavky na přesnost iontové síly a pH roztoků, které proudí elektrochemickým detektorem. [30] Elektrochemická detekce bývá často používána pro stanovení sérové kyseliny askorbové [43].

### 2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

#### 2.5.1 Obecné informace o chromatografii

Chromatografie se řadí mezi separační metody, jejichž princip je založen na oddělování (separaci) jednotlivých složek obsažených ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované.

Chromatografických metod je velké množství a dělí se podle několika hledisek. Podle skupenství mobilní fáze dělíme chromatografické metody na kapalinovou a plynovou, dle uspořádání stacionární fáze na kolonovou a plošnou a podle povahy probíhajícího děje na rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnnou, gelovou nebo afinitní. [44]

#### 2.5.2 Kapalinová chromatografie

Nejrozšířenější separační metodou je kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC) a o něco méně kapalinová adsorpční chromatografie (LSC). [45]

V kapalinové chromatografii se jako mobilní fáze používá kapalina [44]. Není zde velký vliv teploty, protože se většinou pracuje při laboratorní teplotě, což umožňuje separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. [44,45] O separaci složek vzorku rozhodují nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze [44]. Separace je

založena na rozdílné rychlosti distribuce jednotlivých komponentů vzorku mezi stacionární a mobilní fází [46]. Pracuje se obvykle eluční metodou [44].

### **Stacionární fáze**

Základem většiny náplní pro RP-LC, je silikagel, a to buď ve formě porézních částic nepravidelného nebo kulovitého tvaru. Stacionární fáze se vytvoří nanesením vrstvičky chemicky vázaného silikonového polymeru na daný nosič. K modifikaci silikagelu se nejčastěji používá vazby Si–O–Si. Silanolové skupiny ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ) se na silikagelu nechají zreagovat v nepolárním rozpouštědle např. s oktadecyltrichlorsilanem a po reakci a hydrolýze zbylých reaktivních skupin je povrch silikagelu modifikován. Odstranění zbytkových skupin se dosáhne následnou reakcí sorbentu s činidly typu  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ .

Chemicky vázané silikonové polymery jsou velmi odolné vůči hydrolýze a teplu a mají vždy určitou koncovou funkční skupinu, která ovlivňuje vlastnosti chemicky vázané fáze. V běžných komerčních výrobcích se používají tyto typy funkčních skupin:

1. uhlovodíkové (hydrofóbní) skupiny – převážně se užívá oktadecyl, ale také kratší řetězce jako  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ -,  $\text{C}_2\text{H}_5$ -,  $\text{CH}_3$  a fenyl
2. polární skupiny – nitril -  $\text{C}\equiv\text{N}$ , amino  $-\text{NH}_2$  a dioly

V současné době převládají náplně, které mají oktadecylovou funkční skupinu.[45]

Důležitým údajem účinnosti stacionární fáze a tedy kolony je specifická plocha povrchu. Čím je větší, tím více aktivních míst je dostupných pro interakce. Normální silikagelová náplň má specifickou plochu povrchu okolo  $300 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , průměr pórů 10 nm a objem pórů asi  $0,5\text{--}1,0 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ . [46]

### **Mobilní fáze**

V chromatografii s obrácenými fázemi (reverse phase – RP) se pracuje s polárními mobilními fázemi.

Používají se:

- alkoholy (methanol a některé další alifatické alkoholy),
- nitrily (acetonitril),
- ethery (tetrahydrofuran, dioxan, diethylether).

Většinou však mají tyto eluenty příliš velkou eluční sílu a proto se používají ve směsi s vodou. Rozpouštědla používaná jako mobilní fáze, lze seřadit dle rostoucí eluční síly. Nejmenší eluční sílu má voda, teoreticky nejvyšší by měly nasycené uhlovodíky:

voda – methanol – acetonitril – tetrahydrofuran – aceton.

Rozpouštědlo s vyšší eluční silou je schopno eluovat složku z kolony v kratším retenčním čase, než rozpouštědlo s menší silou. Vhodné eluční síly lze dosáhnout mísením dvou nebo tří rozpouštědel o různé eluční síle. [45]

### **Separované složky**

Vzhledem k charakteru nejpoužívanější stacionární fáze jsou nejvíce zadržovány n-alkany. Jejich retence roste se stoupající molekulovou hmotností. Méně jsou zadržovány polárnější uhlovodíky – aromáty a halogenované uhlovodíky.

Pořadí organických látek podle klesající retence v RP-LC je přibližně následující:

alkany – aromáty – halogenové uhlovodíky – ether – nitrosloučeniny – estery – aminy – amidy – kyseliny – sulfokyseliny

Retence polárních složek je malá a látky, které jsou v mobilní fázi zcela disociovány, nejsou vůbec zadržovány a jejich retenční čas se rovná času mrtvému.

V chromatografii s obrácenými fázemi lze značně ovlivnit retenční objemy některých polárních složek upravením hodnoty pH mobilní fáze. Zvýšením pH se zvýší eluční objemy bazických složek a sníží se eluční objemy složek kyselých. Při snížení pH docílíme efektu opačného. Podstatou jevu je zvýšení nebo potlačení disociace kyselých a bazických složek. [45]

### **2.5.3 Instrumentace kapalinové chromatografie**

Základní technické vybavení obsahuje čerpadlo, zařízení na dávkování vzorku, kolonu, detektor a vyhodnovací zařízení. [45]

#### ***Čerpadlo***

Musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze, který se zpravidla pohybuje v rozmezí asi 0,1 až 10 ml.min<sup>-1</sup>.

Nejčastěji se používají čerpadla pístová. Při každém pohybu pístu vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do chromatografického systému a při pohybu zpět se komora naplní. Množství dodávané mobilní fáze se řídí výškou zdvihu pístu nebo změnou počtu zdvihů za časovou jednotku. Výhodou těchto čerpadel je nepřetržitá dodávka mobilní fáze a snadná změna mobilní fáze. Pulzace lze značně omezit použitím zdvojených čerpadel, zařízením tlumiče pulzů a programovaným pohybem pístu. [45]

Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Ventily řídící tok eluentu jsou často zhotoveny z pryže nebo safíru. [44]

#### ***Směšovací zařízení***

Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace. [44]

#### ***Dávkování vzorku***

K dávkování se používá šesticečný kohout s dávkovací smyčkou. Při dávkování se nejprve naplní smyčka vzorkem a poté se kohout přepne do druhé polohy, kdy mobilní fáze protéká smyčkou a unáší vzorek do kolony. Nástřik může být proveden manuálně – pomocí mikrostříkačky, nebo automaticky elektrickým nebo pneumatickým poháněcím zařízením. Komerční smyčky se vyrábí v různých rozměrech: od 0,2 µl (pro mikrokolony), po 20 i více µl. Smyčky se naplňují přesně odměřenými objemy a tak umožňují nástřik libovolného množství až do plného objemu smyčky. [45,46]

Dávkování injekční stříkačkou přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a zejména vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Pokud je použito injekčních zařízení, musí být zhotovena z inertních materiálů (nerezová ocel, titan, některé polymery). [44]

Na eliminaci chyby způsobené ručním nástřikem lze použít autosampler, který bývá používán především v rutinní analýze. Často obsahuje termostat, kterým lze vzorky chladit nebo ohřívat v rozmezí teplot 4–40 °C. [46]

## **Kolony**

Při konstrukci kolon se většinou dává přednost rovným trubicím, jejichž délka se pohybuje mezi 10 až 50 cm. Poměr průměru ku délce se zachovává 1:20 až 1:100 a nejčastěji užívané vnitřní průměry jsou 2–6 mm. V některých případech se spojují dvě kolony v sérii za sebou. Nejběžnějším materiálem pro tlakové kolony je nerezová ocel a tvrzené sklo. U vysokoúčinných kolon je důležité, aby jejich vnitřní průměr byl stejný po celé délce a jejich vnitřní povrch zcela hladký, popř. leštěný. Sorbent, který je v koloně, je uložen na fritě, která může být ze sintrovaného skla, nerezové oceli nebo porézního teflonu. Kolony se plní kulovými částicemi sorbentu o průměru nejčastěji 3, 5 nebo 10  $\mu\text{m}$ . [45]

Běžný průtok eluentu je 0,2–2 ml za minutu. Pro rychlé separace, stačí-li účinnost do 4 000 teoretických pater, jsou vhodné krátké analytické kolony délky jen 3 cm. Jsou levnější a spotřebují malé množství mobilní fáze. Kolony s velmi malým vnitřním průměrem mají vnitřní průměr 1–2 mm a délku 25–50 cm. Mají vysokou účinnost, nejsou drahé a spotřebují málo rozpouštědla (10–100  $\mu\text{l}$  za minutu).

Jako ochrana hlavní kolony jsou hojně používány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření pásů a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály. [44]

## **Nastavení teploty**

Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě a nevyžaduje termostatování. Některé separace se významně zlepší zvýšením teploty, což většina nových chromatografů umožňuje. Programová změna teploty se však v HPLC nevyužívá. [44]

## **Detektory**

Detektor je velmi důležitým, ale také limitujícím prvkem v moderní kapalinové chromatografii. Současné detektory pro kapalinovou chromatografii ve většině případů nejsou schopny zaznamenat všechny eluované složky a neexistuje žádný detektor, pro který by bylo možné obecně předpovědět velikost odezvy v závislosti na koncentraci eluovaných složek. Jednotlivé detektory mají potom další omezení. Kvantitativní analýza je možná pouze pro určitou, předem známou složku a přístroj musí být pro tento účel kalibrován. Zřídka lze kvantifikovat údaje i pro skupiny příbuzných látek a v těch případech je přesnost analýzy nižší. [14] Problém kapalinové chromatografie je v tom, že fyzikální vlastnosti mobilní fáze a vzorku jsou často velmi podobné, což neumožňuje použití univerzálních detektorů, jako je tomu u plynové chromatografie.

Dobrý detektor v kapalinové chromatografii by měl být vysoce citlivý s nízkým detekčním limitem, dobrou selektivitou, rychlou odpovědí a měl by mít široký rozsah linearity. [46]

V kapalinové chromatografii jsou používány následující detektory:

3. optické (fotometrický, fluorimetrický a diferenciální refraktometr)
4. elektrochemické (voltametrický a vodivostní) [45]

**UV detektor** je nejrozšířenějším detektorem používaným v HPLC. Je jednoduchý na obsluhu, citlivý, selektivní a nedestruktivní.

Když světlo prostupuje skrz kapalinu (mobilní fázi), mění se intenzita absorpce v závislosti na koncentraci analytu v mobilní fázi. Mnoho rozpouštědel absorbuje světlo také – především v UV oblasti, což může značně snižovat citlivost. Analyt, který je stanovován musí být



chromofor – absorbovat záření. V opačném případě se musí přistoupit k pre- nebo postkolonové derivatizaci látky.

Eluent protéká měrnou celou, která má objem 5 až 10 µl a optickou délku 10 mm. [45] Pro optimální citlivost detektoru musí být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kvety, jíž prochází paprsek [44]. Vlnová délka u těchto detektorů bývá často volitelná: 190–600 nm [46].

## 2.6 Výťažnost stanovení

Recovery neboli výtěžnost je jedním ze základních parametrů validací. Udává poměr koncentrace (množství) analytu získaného danou analytickou metodou ( $n_{II}$ ) k přijaté referenční hodnotě ( $n_I$ ):

$$R_e = \frac{n_{II}}{n_I}$$

Hodnota výtěžnosti se může vyjadřovat jako desetinný zlomek nebo v procentech. [47]

## 2.7 Parametry kolony

### 2.7.1 Retenční charakteristiky

Jednou ze základních veličin chromatografických metod je **retenční čas  $t_R$** . Jedná se o čas od nástřiku vzorku do kolony po dosažení maxima chromatografického píku. Retenční čas dané látky závisí na distribuční konstantě, průtoku mobilní fáze, na délce a průměru kolony a na objemu mobilní a stacionární fáze v koloně.

**Mrtvý objem  $V_M$**  lze definovat jako objem mobilní fáze obsažené v koloně nebo objem mobilní fáze, který je potřeba k eluci vhodné v koloně nezadržované látky z místa nástřiku na konec kolony. Lze ho určit dle vzorce:

$$V_M = \frac{L \cdot d_c^2 \cdot \varepsilon_T \cdot \pi}{4},$$

kde  $L$  je délka kolony (cm),  $d_c$  je vnitřní průměr kolony (cm) a  $\varepsilon_T$  je celková porozita náplně kolony, jejíž průměrná hodnota je 0,7.

**Mrtvý čas  $t_M$**  je definován vztahem:

$$t_M = \frac{V_M}{F_m},$$

kde  $F_m$  je průtok mobilní fáze (ml.min<sup>-1</sup>).

**Kapacitní poměr (faktor)  $k'$**  umožňuje porovnat retence analyzovaných látek, posuzovat vliv změn chromatografických podmínek na separaci a porovnávat analýzy v různých laboratořích.

Jde o poměr množství analytu ve stacionární fázi ku množství analytu v mobilní fázi za podmínek rovnováhy. Čím vyšší je jeho hodnota, tím větší je retence analytu v koloně.

Lze jej vypočítat dle vztahu:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}.$$

### 2.7.2 Účinnost a kvalita kolony

**Počet teoretických pater  $n$**  je jednou z veličin určujících účinnost kolony. Charakterizuje rozmývání zóny analytu transportovaného kolonou a je určen vztahem:

$$n = \frac{V_R^2}{\sigma_V^2},$$

kde  $V_R$  je retenční objem analytu (ml) a  $\sigma_V$  je variance jeho eluovaného zóny (ml).

Čím vyšší je počet teoretických pater, tím méně je zóna analytu v koloně rozmývána. [48]

Pro určení asymetrie píku se používají dvě veličiny: faktor asymetrie a tailing faktor.

**Faktor asymetrie  $A_s$**  je definován jako poměr šířky píku vzestupné části ( $t_p$ ) k šířce sestupné části píku ( $f_p$ ). Bývá počítán nejčastěji v 5 nebo 10 % výšky píku:

$$A_s = \frac{t_p}{f_p}.$$

**Tailing faktor  $T$**  lze vyjádřit jako šířku píku k dvojnásobku šířky píku vzestupné části  $f_p$  v 5 % výšky píku:

$$T = \frac{f_p + t}{2f_p}.$$

V ideálním případě, kdy je pík souměrný, hodnoty faktorů jsou rovny jedné. Pokud jsou vyšší než jedna, pík chvostuje a v opačném případě (kdy je hodnota nižší než jedna) dochází k frontování píku.

Mezi oběma faktory existuje vztah:

$$A = 2T - 1. [47]$$

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Pomůcky

- běžné laboratorní sklo,
- tlouček s třecí miskou
- vývěva
- injekční stříkačky, 2 ml (Chirana Injecta, SR)
- mikrostříkačka, 25  $\mu$ l (Hamilton, USA)
- celulózové mikrofiltry 0,45  $\mu$ m (Chromservis, ČR)
- filtrační papír č. 0, 4, 5 (Papírny Perštejn, ČR)
- mikropipeta (Biohit, Finsko)

#### 3.2 Přístroje

- ultrazvuková lázeň (Kraintek, SR)
- chladnička s mrazničkou (Gorenje, Slovinsko)
- kuchyňský mixér (Bosch, Německo)
- přístroj na přípravu demineralizované vody (Watrex, ČR)
- analytické váhy (Boeco, Germany)
- HPLC přístroj (Waters, USA)
  - pumpa: Waters 1515 Isocratic HPLC Pump
  - UV detektor: Waters 2487 Dual Absorbance Detector
- počítač DELL, HPLC systém obsluhován pomocí softwaru Breeze

#### 3.3 Chemikálie

- redestilovaná voda
- kyselina L-askorbová (Riedel-de Haen, Německo)
- kyselina monohydrogenfosforečná (Fluka, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema a.s., ČR)
- methanol, HPLC-grade (Sharlau chemie a.s., Španělsko)
- kyselina šťavelová, dihydrát (Lach-Ner, ČR)

#### 3.4 Testování možných separačních systémů pro stanovení vitamínu C

##### 3.4.1 Příprava roztoků

###### *Mobilní fáze – kyselina šťavelová*

- **Roztok 0,01 M kyseliny šťavelové**

Navážka 1,2607 g kyseliny šťavelové byla rozpuštěna v 1 litru redestilované vody a 10 minut ponechána v ultrazvukové lázni.

- **Zásobní standardní roztok kyseliny askorbové ve vodě**

Navážka 0,0500 g kyseliny askorbové byla rozpuštěna ve 50 ml redestilované vody. Vznikl tak roztok kyseliny askorbové o koncentraci 1 g.l<sup>-1</sup>.

- **Extrakční roztok kyseliny šťavelové**

Navážka 4,0000 g kyseliny šťavelové byla rozpuštěna v 200 ml redestilované vody. Vznikl tak 2% roztok kyseliny šťavelové. Roztok byl uchováván v lednici.

- **Zásobní standardní roztok kyseliny askorbové**

Navážka 0,0500 g kyseliny askorbové byla rozpuštěna v 50 ml extrakčního roztoku – 2% kyseliny šťávelové.

**Mobilní fáze –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : methanol (9:1)**

- **Roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : methanol (9:1)**

Navážka 13,6025 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  byla rozpuštěna v 900 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 100 ml methanolu a roztok byl na ultrazvuku odplyněn.

- **Extrakční roztok kyseliny monohydrogenfosforečné**

Nejdříve byl připraven 10% roztok kyseliny monohydrogenfosforečné rozpuštěním 10 g kyseliny ve 100 ml horké redestilované vody. Těchto 100 ml bylo poté naředěno v poměru 1:4 redestilovanou vodou na celkový objem 500 ml. Vznikl tak 2% roztok kyseliny monohydrogenfosforečné. Roztok byl uchováván v lednici.

- **Standardní roztok kyseliny askorbové**

Navážka 0,0500 g kyseliny askorbové bylo rozpuštěno v 50 ml 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné. Roztok byl uchováván v lednici.

### 3.4.2 Testování kolon

U každé mobilní fáze byl zhotoven zásobní standardní roztok kyseliny askorbové v daném rozpouštědle o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$ . Z něho pak byly před každou analýzou připravovány pracovní roztoky o nižších koncentracích. U většiny analýz byla zhotovena krátká kalibrační křivka o koncentracích  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Každá z šesti testovaných kolon byla proměřena dvěma výše uvedenými systémy. Přehled parametrů a nastavení HPLC kolon je uveden v tabulce č. 2. Hlavní sledované veličiny byly: retenční čas, počet teoretických pater, tailing faktor a faktor asymetrie.

Tabulka č. 2: Parametry kolon použitých pro analýzu vitamínu C

Kolona	Výrobce	délka (mm)	průměr (mm)	průměr částic ( $\mu\text{m}$ )	počet C	průtok ( $\text{ml.min}^{-1}$ )
XTerra	Waters	150	3	3,5	18	0,3
XBridge	Waters	150	3	3,5	18	0,3
Zorbax	Agilent	150	4,6	5	18	1
Gemini	Phenomenex	150	4,6	5	18	1
Supelcosil 8DB	Sigma-Aldrich	250	4,6	5	8	1
Supelcosil 18DB	Sigma-Aldrich	150	4,6	5	18	1

Objem nastříknutého vzorku byl vždy  $10 \mu\text{l}$ . Analýzy byly prováděny při nastavení termostatu na  $30^\circ\text{C}$  a detekovány na UV detektoru při  $254 \text{ nm}$ .

### 3.4.3 Srovnání metod pro stanovení vitamínu C v rakytníku

Měření proběhlo na koloně Gemini C18, rozměry  $150 \times 4,6 \text{ mm}$  s průměrem částic  $5 \mu\text{m}$ . Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ . Velikost nástřiku byla vždy  $10 \mu\text{l}$ . Analýzy proběhly při teplotě  $30^\circ\text{C}$  a analyty byly sledovány při vlnové délce  $254 \text{ nm}$ .

### 3.4.3.1 Obecný postup

U každé metody byly analyzovány vždy tři vzorky z každé ze čtyř odrůd rakytníku: Kyjevský, Leicora, Olejová a Vitamínová.

Tab. č. 3: Přehled testovaných metod

metoda	extrakční činidlo	mobilní fáze
1	2% kyselina monohydrogenfosforečná	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : methanol (9:1)
2	2% kyselina šťavelová	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : methanol (9:1)
3	2% kyselina šťavelová	0,01 M kyselina šťavelová
4	2% kyselina monohydrogenfosforečná	0,01 M kyselina šťavelová

- **Příprava standardů kalibrační křivky**

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny askorbové rozpuštěné v 2% roztoku extrakčního činidla byly připraveny standardní roztoky kalibrační křivky zředěním zásobního roztoku roztokem rozpouštědla. Každá koncentrace byla připravována ze zásobního roztoku vždy bezprostředně před nástřikem. Zásobní roztok byl mezi přípravou jednotlivých koncentrací skladován v ledničce.

- **Příprava vzorku rakytníku na analýzu**

Z každé odrůdy byly s přesností na 4 desetinná místa na analytických vahách odváženy tři vzorky o hmotnosti asi 4 g a zality asi 15 ml extrakčního činidla. Poté byl vzorek rozmělněn tloučkem v třecí misce po dobu asi 1 minuty, kvantitativně převeden do 25ml odměrné baňky a doplněn rozpouštědlem po rysku. Po promíchání byla část vzorku zfiltrována přes řídký filtr, z filtrátu bylo odebráno pipetou 2,5 ml. Tento objem byl převeden do další odměrné baňky a doplněn rozpouštědlem po rysku – 25 ml. Dále byla část naředěného vzorku z odměrné baňky zfiltrována na středně hustém filtru. Filtrát byl přes  $0,45 \mu\text{m}$  celulózový filtr nasán do stříkačky a nastříknut 3krát do chromatografu.

### 3.4.3.2 Výtěžnost

Byly porovnávány dva odlišné chromatografické systémy (metoda 1 a 3 – viz tab. č. 3). Postup přípravy vzorků byl opakován jak pro systém s kyselinou šťavelovou (metoda 3), tak pro systém s kyselinou monohydrogenfosforečnou, dihydrogenfosforečnanem draselným a methanolem (metoda 1).

- **Příprava vzorku**

Nejprve bylo odpočítáno 16 nebo 18 ks plodů rakytníku a každý kus byl podélně rozříznut nožem napůl. Každá polovina byla přemístěna do dvou připravených zvážených kádinek, tudíž vznikly 2 vzorky, které měly co nejvyváženější složení. Polovina plodu se semenem byla střídavě umístěna do obou vzorků. Kádinky byly poté zváženy a do vzorku 2 bylo přidáno 2,5 mg vitaminu C v roztoku extrakčního činidla. Půl mililitru, ve kterém byl vitamin rozpuštěn, bylo pipetou opatrně nanášeno na rozřezanou dužinu plodu.

Následně byly vzorky zpracovány jako při běžné analýze – viz. kapitola 3.6.2 (u systému s kyselinou šťavelovou byl vzorek ředěn 10krát, u druhého použitého systému byl vzorek zředěn 20krát), a nastříknuty do přístroje. Takto byly analyzovány tři vzorky 2 odrůd.

Výpočet byl proveden dle kapitoly 2.6.1, přičemž referenční hodnota  $n_I$  byla vypočtena dle vzorce:

$$n_I = \frac{2,5}{m},$$

kde  $n_I$  je množství, o kolik mg na 100 g vzorku by měla při 100% výtěžnosti mít hodnota množství vitamínu C ve vzorku 2 s přídatkem (mg.100 g<sup>-1</sup>), 2,5 je množství přidaného vitamínu C do navážky (mg) a  $m$  je navážka plodů vzorku 2 s přídatkem (g).

Skutečná hodnota  $n_{II}$  byla vypočtena rozdílem naměřených hodnot vzorku s přídatkem a bez přídatku. Výtěžnost byla vyjádřena v procentech.

### 3.5 Úprava rostlinných matric pro analýzu

Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr s methanolem a extrakční činidlo v podobě 2% kyseliny monohydrogenfosforečné. Roztoky byly připraveny dle kapitoly 3.4.1. Podmínky měření jsou popsány v kapitole 3.4.3.

#### 3.5.1 Úprava kdoulí pro analýzu

Byly studovány dva způsoby přípravy vzorku z kdoulí odlišné ve způsobu rozmělnění dužiny plodu (mixování a strouhání).

##### *Úprava strouháním*

Na jemném kuchyňském struhadle byla nastrohávána část plodu, odváženo přibližně 20 g, zalito asi 30 ml extrakčního činidla, promícháno a přefiltrováno do 50ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po značku a podroben analýze.

##### *Úprava mixováním*

Navážené množství kdoule bylo zalito asi 30 ml rozpouštědla a kuchyňským ponorným mixérem rozmixováno na co nejmenší části. Poté byl vzorek zfiltrován přes filtrační papír do 50 ml odměrné baňky a doplněn extrakčním roztokem po značku.

#### 3.5.2 Úprava rakytníků pro analýzu

##### *Filtrace*

Vzorky byly připravovány dvěma způsoby:

Při prvním způsobu byl po zvážení vzorek v třecí misce tloučkem spolu s 10 ml rozpouštědla zhomogenizován a přefiltrován na Büchnerově nálevce. Zfiltrovaný vzorek byl kvantitativně převeden do odměrné baňky na 25 ml a doplněn po rysku. Z vzorku bylo odebráno 2,5 ml, napipetováno do druhé odměrné baňky a doplněno po 25 ml. Tento roztok byl zfiltrován, filtrát byl přes 0,45 µm celulókový filtr nasán do stříkačky a 3krát nastříknut do systému.

Vzorek při druhém způsobu zpracování byl po zvážení a homogenizaci převeden do 25 ml odměrné baňky i s tuhými částicemi (semena, slupky), doplněn po značku extrakčním činidlem a zfiltrován. Filtrát byl 10krát naředěn, znovu zfiltrován a poté byl podroben analýze.

##### *Extrakční činidlo*

Na přípravu vzorku byla použita dvě různá extrakční činidla:

- 2% kyselina monohydrogenfosforečná
- 2% kyselina šťavelová

### ***Doba prodlení u extrakce***

Na třech vzorcích jedné odrůdy (odrůda Kyjevský) byla sledována různá doba prodlení u extrakce – vystavení rozmělněných plodů extrakčnímu činidlu.

Po navážení vzorku a jeho homogenizaci a převedení do odměrné baňky bylo s baňkou třepáno po dobu 0, 5, 10 a 15 minut. Poté byl vzorek zfiltrován, naředěn a podroben analýze.

### ***Omezený přístup světla, tepla***

Extrakční roztok byl uložen v lednici. Veškeré laboratorní sklo, které přišlo se vzorkem do styku bylo vychlazeno a obaleno zvenku hliníkovou fólií pro udržení teploty a zamezení přístupu světla. Analýza byla prováděna za sníženého osvětlení a vzorek byl filtrován v lednici.

Zmražený vzorek byl odvážen na analytických vahách do vychlazené kádinky obalené v hliníkové fólii. Bezprostředně byl přelit extrakčním činidlem vychlazeným v lednici a homogenizován tloučkem v třecí misce, které byly uchovávány v mrazničce. Rozmělněný vzorek byl kvantitativně převeden do vychlazené odměrné baňky obalené v alobalu a doplněn po značku extrakčním činidlem. Následná filtrace proběhla v lednici (tma, chlad). Po naředění a filtraci byl vzorek bezprostředně zanalyzován.

## **3.6 Stanovení vitaminu C v plodech vybraných druhů ovoce pomocí HPLC**

Měření proběhlo na koloně Gemini C18, rozměry 150 x 4,6 mm s průměrem částic 5  $\mu\text{m}$ . Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Velikost nástriku byla vždy 10  $\mu\text{l}$ . Analýzy proběhly při nastavení termostatu na 30  $^{\circ}\text{C}$  a analyt byl sledován při vlnové délce 254 nm.

Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr s methanolem a extrakční činidlo v podobě 2% kyseliny monohydrogenfosforečné. Roztoky byly připraveny dle kapitoly 3.4.1.

### **3.6.1 Stanovení vitaminu C v plodech kdouloně**

#### ***Kalibrační křivka***

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci 1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny askorbové rozpuštěné v 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné byly připraveny standardní roztoky kalibrační křivky o koncentracích 5, 10, 15, 20, 25, 30 a 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  zředěním zásobního roztoku roztokem 2% kyseliny monohydrogenfosforečné.

#### ***Příprava vzorku pro analýzu***

Vzorky pro analýzu vitaminu C v kdoulích byly připraveny následujícím postupem. Nejdříve byly z jednoho plodu odkrojeny nožem dva vzorky po přibližně 20 g, které byly zváženy na 4 desetinná místa na analytických vahách a zality asi 30 ml extrakčního činidla. Poté byl vzorek rozmixován kuchyňským ponorným mixérem a přefiltrován přes řídký filtr a následně přes středně hustý do 50ml odměrné baňky a doplněn extrakčním roztokem po značku. Dále byl přefiltrován přes mikrofiltr a nastříknut do přístroje.

Kyselina askorbová byla poté identifikována porovnáním retenčních časů píků na chromatogramech roztoků kalibrační křivky. Plocha píku kyseliny askorbové byla stejně jako v případě roztoků kalibrační křivky získána integrací v systému Breeze. Ze tří nástriků byla vypočtena průměrná plocha píku a dle regresní rovnice kalibrační křivky byla stanovena průměrná koncentrace kyseliny askorbové v daném extraktu (v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tato hodnota byla přepočtena na navážku původního vzorku a vyjádřena v mg na 100 g plodů dle vztahu:

$$c = \frac{x \cdot V \cdot F \cdot 0,1}{m},$$

kde  $c$  je výsledná koncentrace vitamínu C přepočtená na 100 g plodů ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ),  $x$  je koncentrace vitamínu C odečtená z kalibrační křivky ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $V$  je objem v kterém byla rozpuštěna navážka vzorku (ml),  $F$  je faktor zředění, 0,1 je koeficient pro přepočet na 100 g plodů a  $m$  je hmotnost navážky plodů pro daný vzorek (g).

### 3.6.2 Stanovení vitamínu C v plodech rakytníku

#### *Kalibrační křivka*

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kyseliny askorbové rozpuštěné v 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné byly připraveny standardní roztoky kalibrační křivky o koncentracích 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  zředěním zásobního roztoku roztokem 2% kyseliny monohydrogenfosforečné. Každá koncentrace byla připravována ze zásobního roztoku vždy bezprostředně před nástřikem. Zásobní roztok byl mezi měřeními jednotlivých koncentrací skladován v ledničce.

#### *Příprava vzorku pro analýzu*

Vzorky pro analýzu vitamínu C v plodech rakytníku byly připraveny následujícím postupem. Nejprve byly naváženy s přesností na 4 desetinná místa na analytických vahách tři vzorky o hmotnosti asi 4 g a zality přibližně 15 ml extrakčního činidla. Poté byl vzorek rozmělněn tloučkem v třecí misce přibližně 1 minutu, kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn rozpouštědlem po rysku. Po promíchání byla část vzorku zfiltrována přes řídký filtr, z filtrátu bylo odebráno pipetou 1,25 ml. Tento objem byl převeden do další odměrné baňky a doplněn rozpouštědlem po rysku – 25 ml. V následném kroku byla část naředěného vzorku z odměrné baňky zfiltrována na středně hustém filtru. Filtrát byl přes  $0,45 \mu\text{m}$  nylonový filtr nasán do stříkačky a nastříknut do systému.

Kyselina askorbová byla poté identifikována porovnáním retenčních časů píků na chromatogramech roztoků kalibrační křivky. Plocha píku kyseliny askorbové byla stejně jako v případě roztoků kalibrační křivky získána integrací v systému Breeze. Ze tří nástřiků byla vypočtena průměrná plocha píku a dle regresní rovnice kalibrační křivky byla stanovena průměrná koncentrace kyseliny askorbové v daném extraktu (v  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Tato hodnota byla přepočtena na navážku původního vzorku a vyjádřena v mg na 100 g plodů dle vztahu:

$$c = \frac{x \cdot V \cdot F \cdot 0,1}{m},$$

kde  $c$  je výsledná koncentrace vitamínu C přepočtená na 100 g plodů ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ),  $x$  je koncentrace vitamínu C odečtená z kalibrační křivky ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $V$  je objem v kterém byla rozpuštěna navážka vzorku (ml),  $F$  je faktor zředění, 0,1 je koeficient pro přepočet na 100 g plodů a  $m$  je hmotnost navážky plodů pro daný vzorek (g).



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro stanovení kyseliny askorbové v potravinách existuje mnoho postupů (viz. kapitola 2.4). Většina z nich používá reverzní fáze, jako mobilní fázi fosfátový pufr a extrakční činidlo v podobě kyseliny monohydrogenfosforečné (metafosforečné). Nakonec byla jako hlavní použita metoda dle normy [1] a [49]. Druhý systém používající kyselinu šťavelovou byl převzat dle [50].

### 4.1 Testování možných separačních systémů pro stanovení vitaminu C

#### 4.1.1 Testování kolon

K experimentu bylo přistoupeno za účelem vybrání nejvhodnější kolony ke stanovení vitaminu C.

Testování kolon bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.2.

V příložené tabulce č. 4 je srovnání jednotlivých parametrů všech šesti systémů se dvěma různými mobilními fázemi.

Tabulka č. 4: Srovnání parametrů jednotlivých systémů pro stanovení vitaminu C pomocí HPLC

kolona	mobilní fáze	retenční čas (min)	počet teoretických pater	k'	tailing faktor	faktor asymetrie
XTerra	pufr	3,3	5 801	-0,347	1,288	1,288
	kš	3,9	4 340	0,634	1,253	1,253
XBridge	pufr	2,7	4 881	0,773	1,269	1,269
	kš	3,2	3 189	0,615	1,193	1,193
Zorbax	pufr	7,0	4 797	2,494	1,328	1,328
	kš	2,4	5 473	1,022	1,196	1,196
Gemini	pufr	2,0	13 074	0,468	1,046	1,046
	kš	3,4	9 636	1,842	1,021	1,021
Supelcosil C8	pufr	3,2	10 069	0,582	1,106	1,106
	kš	4,5	14 814	0,758	1,052	1,052
Supelcosil C18	pufr	1,9	9 401	0,785	0,993	0,993
	kš	2,9	8 518	0,991	1,043	1,043

vysvětlivky: pufr – mobilní fáze s fosfátovým pufrém ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a methanolem (9:1)  
kš – mobilní fáze s 0,01 M kyselinou šťavelovou

Vyhodnocením sledovaných parametrů byla vybrána kolona, která poskytovala nejlepší píky.

#### **Mobilní fáze – kyselina šťavelová**

U systémů s kyselinou šťavelovou jako mobilní fází se při použití 2% roztoku kyseliny šťavelové jako extrakčního činidla objevoval v chromatogramech vysoký pík kyseliny šťavelové. Téměř ve všech případech byly retenční časy kyseliny askorbové v tomto systému delší než v případě druhé použité mobilní fáze.

U této mobilní fáze byl s ohledem na vysoký pík extrakčního činidla použit ještě jeden extrakční roztok – destilovaná voda. Bylo zjištěno, že ve vodě je množství naměřeného

vitaminu C menší než v kyselině šťavelové. Jeho stabilita také klesala v závislosti na čase daleko více než v případě extrakce 2% kyselinou šťavelovou. Vliv na množství vitaminu v roztoku měla i teplota skladování.

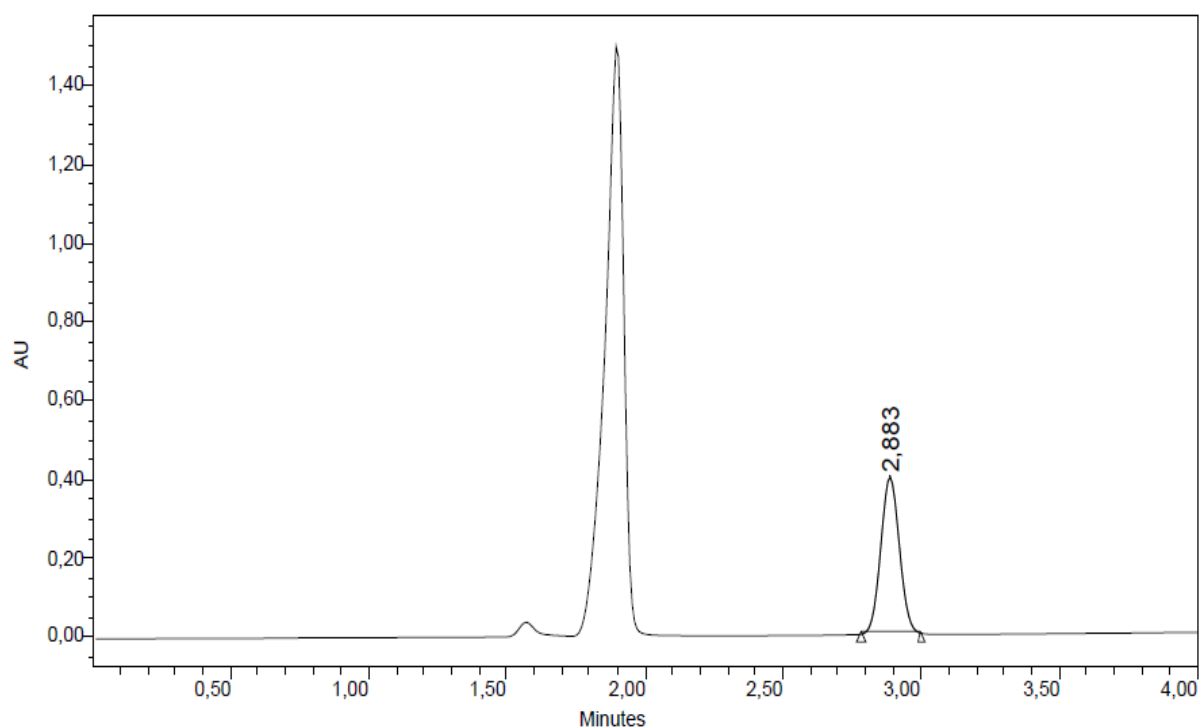
Byly zanalyzovány standardní zásobní roztoky vitaminu C o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  rozpuštěné ve vodě nebo 2% kyselině šťavelové skladované po 4 dny v lednici nebo při laboratorní teplotě. Každý vzorek byl těsně před nástřikem zředěn na koncentraci  $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ . Výsledky jsou v tabulce č. 5 vyjádřeny v procentech vzhledem k původně naměřené hodnotě:

Tabulka č. 5: Test stability standardního roztoku kyseliny askorbové (v %)

rozpuštědlo	lednice	laboratorní teplota
Voda	87	86
2% kyselina šťavelová	99	90

Hodnoty mohou být ovlivněny nepřesným ředěním standardních roztoků, aby mohly být podrobeny analýze.

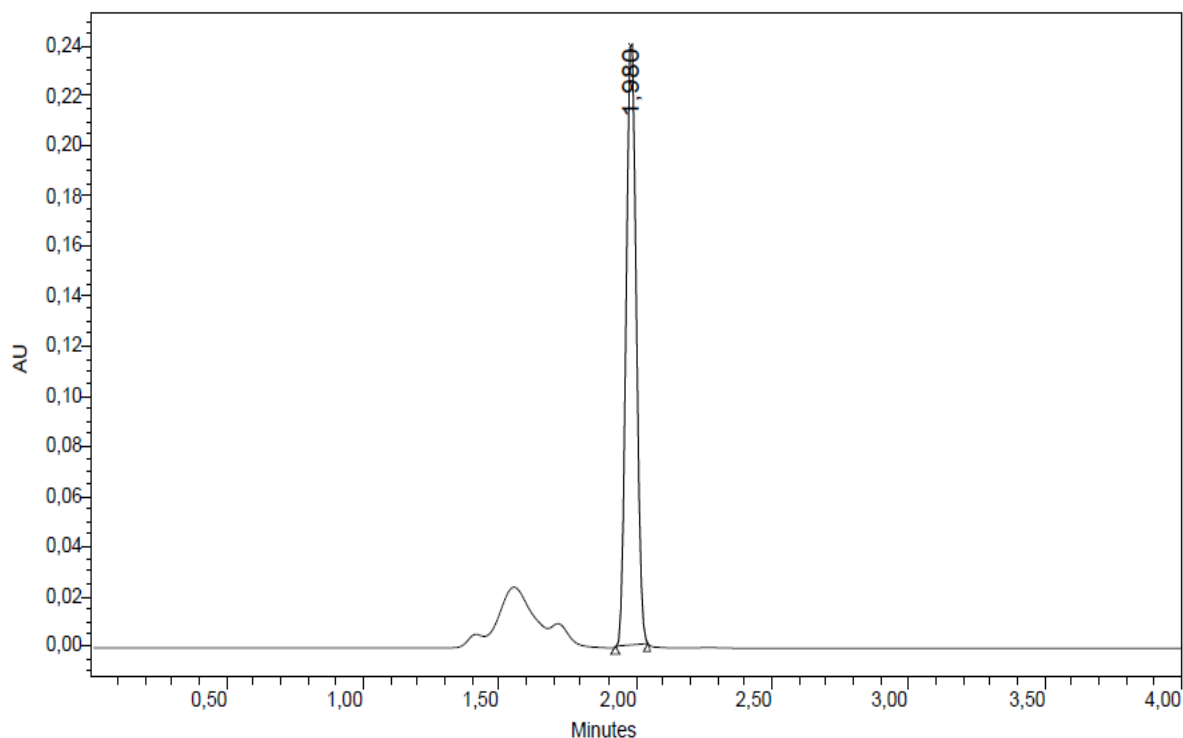
Na obrázku č. 12 je chromatogram, kde probíhala analýza vitaminu C v tomto systému nejlépe.



Obr. č. 12: Chromatogram standardního roztoku kyseliny askorbové o koncentraci  $0,05 \text{ g.l}^{-1}$  v 2% kyselině šťavelové na koloně ZORBAX.

#### Mobilní fáze – $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : methanol (9:1)

U systémů s extrakčním činidlem v podobě 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné byl těsně před píkem kyseliny askorbové detekován pík extrakčního roztoku, který ve většině případů zasahoval i do píků kyseliny askorbové. U kolony Gemini byly rozdíly v retenčních časech obou kyselin největší (viz obrázek č. 13)



Obr. č. 13: Chromatogram standardního roztoku kyseliny askorbové o koncentraci  $0,01 \text{ g.l}^{-1}$  v 2% extrakčním roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné na koloně Gemini.

#### 4.1.2 Srovnání metod pro stanovení vitamínu C v rakytníku

K tomuto experimentu bylo přistoupeno z důvodu nesrovnalostí s hodnotami, které byly naměřeny před 2 lety na stejných vzorcích plodů rakytníku, jenž byly po tyto dva roky skladovány v mrazničce. V tehdejší diplomové práci [50] byl použit systém s kyselinou šťavelovou jako mobilní fází i extrakčním činidlem. Proto bylo přistoupeno k experimentu, který si kladl za cíl zjistit příčinu rozdílu. Vitamin C byl stanovován čtyřmi metodami, které kombinovaly použití 2 mobilních fází a 2 extrakčních činidel. Přehled možných 4 kombinací je uveden v tabulce č. 3 a obecné pracovní postupy jsou popsány v kapitole 3.4.3. Dílčí výsledky pro metodu č. 1 jsou zmíněny v kapitole 4.3.2. V kapitole 4.1.2.4 jsou shrnuty celkové výsledky experimentu srovnání metod.

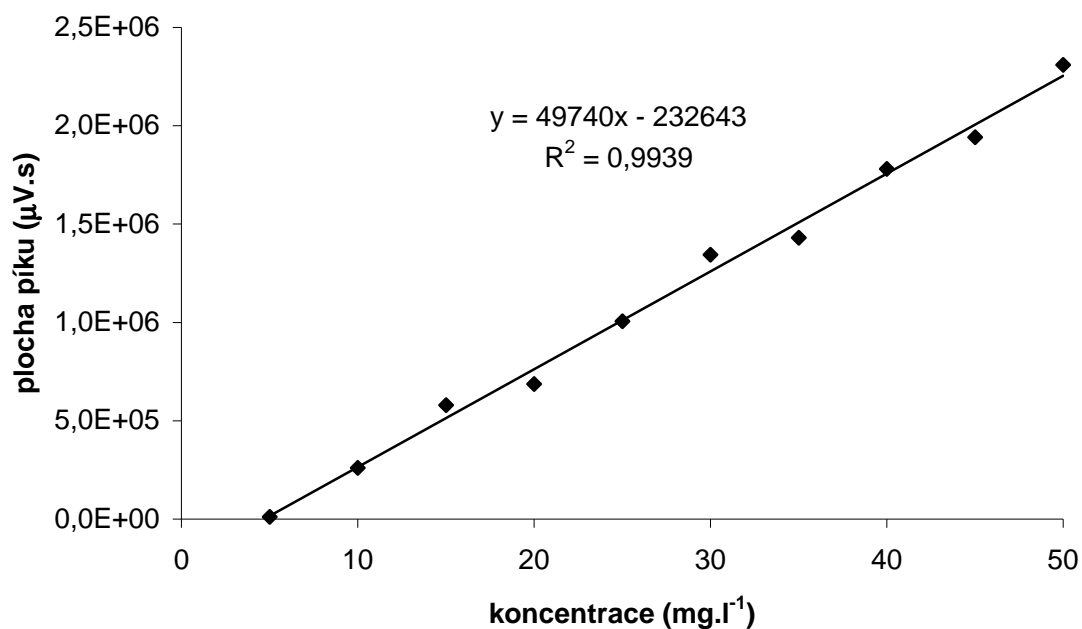
##### 4.1.2.1 Metoda 2

- Sestrojení kalibrační závislosti

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny askorbové rozpuštěné v 2% roztoku kyseliny šťavelové byly připraveny standardní roztoky kalibrační křivky o koncentracích 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  zředěním zásobního roztoku vitamínu C roztokem 2% kyseliny šťavelové.

Tabulka č. 6: Kalibrační křivka

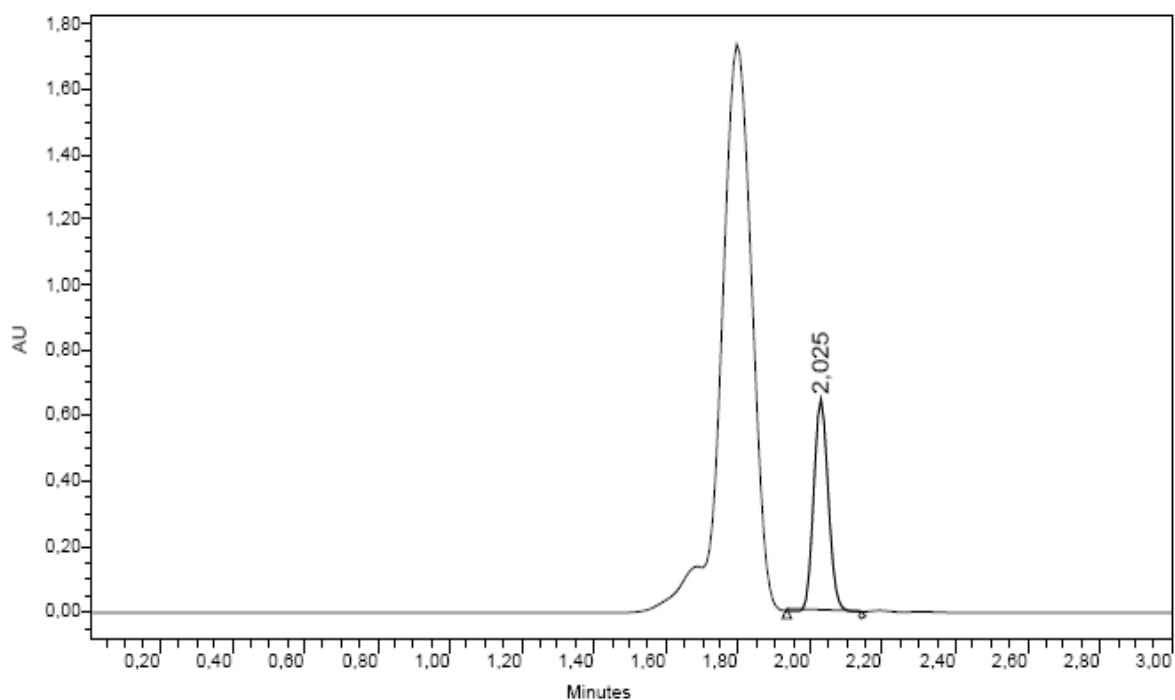
<b>koncentrace</b> (mg.l <sup>-1</sup> )	<b>plocha píku</b> (μV.s)
5	11 000
10	261 000
15	579 000
20	687 000
25	1 005 000
30	1 345 000
35	1 430 000
40	1 781 000
45	1 942 000
50	2 310 000



Obr. č. 14: Kalibrační křivka

- **Stanovení vitamínu C ve vybraných odrůdách plodů rakytníku**

Analýza trvala 3 minuty – retenční čas kyseliny askorbové byl 2,0 minuty. Retenční čas kyseliny šťavelové se pohyboval okolo 1,8 minuty. Následující chromatogram na obrázku č. 15 zachycuje ukázkou analýzy extraktu z odrůdy Kyjevský, který byl obdržen za podmínek popsaných metodou 2.



Obr. č. 15: Ukázka chromatogramu odrůdy Kyjevský metodou 2

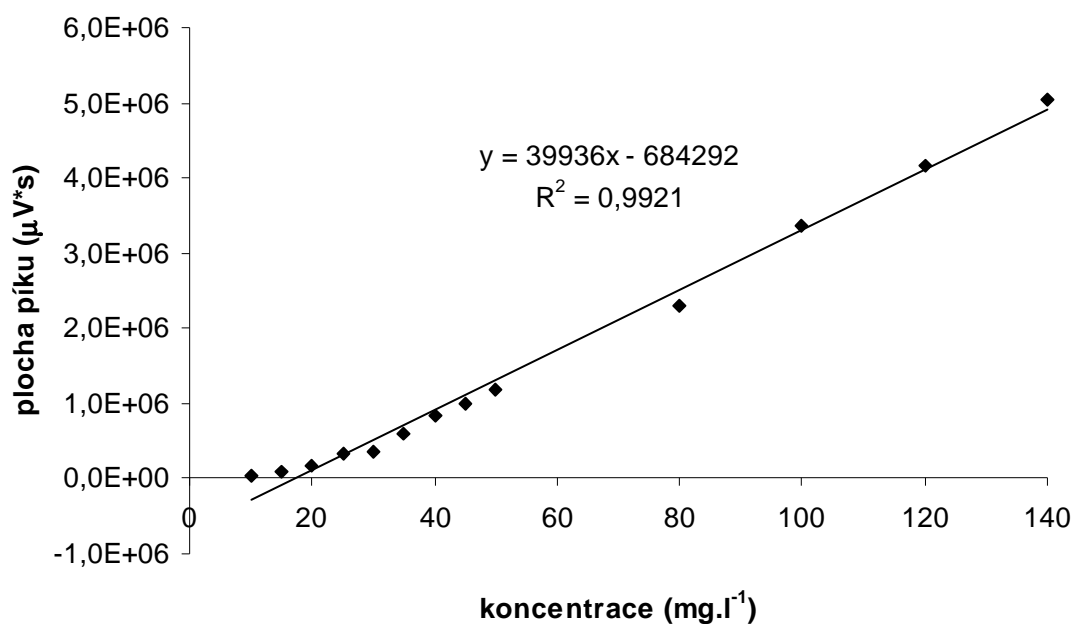
#### 4.1.2.2 Metoda 3

- **Sestrojení kalibrační závislosti**

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny askorbové rozpuštěné v 2% roztoku kyseliny šťavelové byly připraveny standardní roztoky kalibrační křivky o koncentracích 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 80, 100, 120 a  $140 \text{ mg.l}^{-1}$  zředěním zásobního roztoku vitaminu C roztokem 2% kyseliny šťavelové.

Tabulka č. 7: Kalibrační křivka

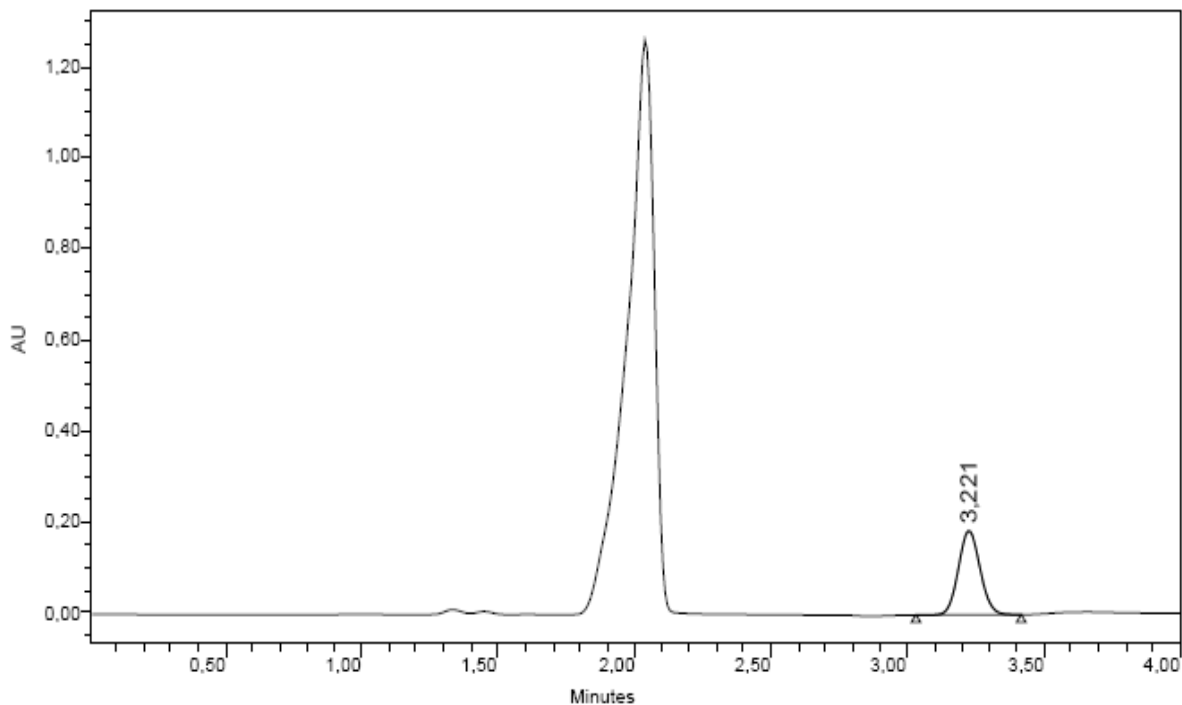
<b>koncentrace</b> ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	<b>plocha píku</b> ( $\mu\text{V.s}$ )
10	29 000
15	79 000
20	166 000
25	321 000
30	355 000
35	606 000
40	827 000
45	995 000
50	1 191 000
80	2 306 000
100	3 366 000
120	4 166 000
140	5 051 000



Obr. č. 16: Kalibrační křivka

- **Stanovení vitamínu C ve vybraných odrůdách plodů rakytníku**

Analýza trvala 4 minuty – retenční čas kyseliny askorbové byl 3,2 minuty. Retenční čas kyseliny šťavelové byl 2,0 minuty. Obrázek č. 17 zachycuje chromatogram extraktu připraveného z odrůdy Kyjevský a analyzovaného podmínkami metody 3.



Obr. č. 17: Ukázka chromatogramu odrůdy Kyjevský metodou 3

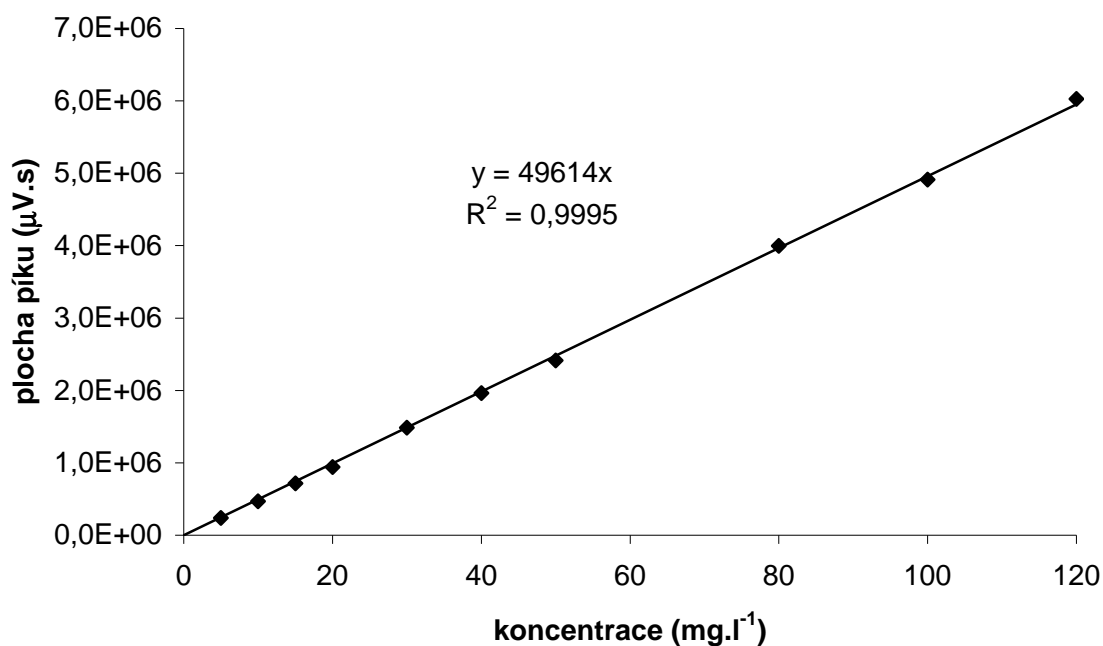
#### 4.1.2.3 Metoda 4

- **Sestrojení kalibrační závislosti**

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny askorbové rozpuštěné v 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné byly připraveny standardní roztoky kalibrační křivky o koncentracích 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80, 100 a  $120 \text{ mg.l}^{-1}$  zředěním zásobního roztoku roztokem 2% kyseliny monohydrogenfosforečné.

Tabulka č. 8: Kalibrační křivka

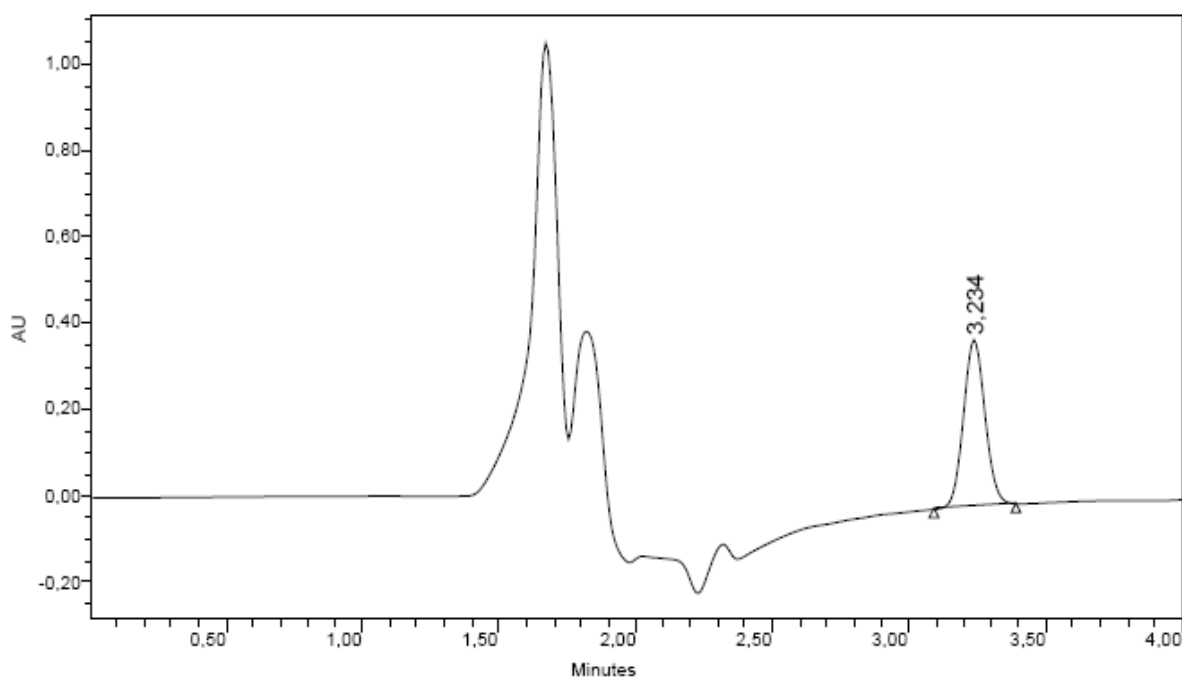
koncentrace ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	plocha píku ( $\mu\text{V.s}$ )
5	237 000
10	470 000
15	718 000
20	942 000
30	1 487 000
40	1 962 000
50	2 415 000
80	3 995 000
100	4 913 000
120	6 026 000



Obr. č. 18: Kalibrační křivka

- **Stanovení vitamínu C ve vybraných odrůdách plodů rakytníku**

Analýza trvala 4 minuty – kyselina askorbová eluovala průměrně v čase 3,2 minut. Následující chromatogram na obrázku č. 19 ukazuje nástřik extraktu odrůdy Kyjevský zhotoveného podle metody 4.



Obr. č. 19: Ukázka chromatogramu odrůdy Kyjevský metodou 4

#### 4.1.2.4 Výsledky srovnání čtyř metod

Tento experiment si kladl za cíl zjistit příčinu rozdílu od hodnot získaných z [50] a hodnot naměřených vyzkoušením různých kombinací extrakčních činidel a mobilních fází obou použitých systémů. Důvod rozdílných hodnot avšak nebyl nalezen.

Při měření jednotlivých koncentrací kalibrační křivky i vzorků rozpuštěných v 2% kyselině šťavelové docházelo v rámci jednoho vzorku k ubývání detekovaného množství kyseliny askorbové – plocha píků se snižovala od prvního k třetímu (poslednímu) nástřiku (viz. tabulka č. 9). Uchováváním injekční stříkačky se vzorkem v lednici mezi jednotlivými nástřiky daného vzorku nebyly zaznamenány podstatné změny.

Tabulka č. 9: Hodnoty ploch píků analyzované odrůdy Leicora ( metodou č. 2)

nástřik	plocha píku ( $\mu V \cdot s$ )		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
1	1 456 664	1 366 285	1 316 091
2	1 828 511	1 752 327	1 716 182
3	1 698 557	1 676 604	1 647 343

Následující tabulka ukazuje srovnání jednotlivých kvalitativních parametrů metod:

Tabulka č. 10: Kvalitativní parametry čtyř metod

metoda	retenční čas (min)	počet teoretických pater	k'	tailing faktor	faktor asymetrie
1	2,05	11 587	0,519	1,109	1,109
2	2,05	10 161	0,517	1,123	1,123
3	3,26	8 315	1,719	1,039	1,039
4	3,27	8 203	1,726	1,043	1,043



Píky kyseliny askorbové s kyselinou šťavelovou jako mobilní fází (metody 3 a 4) měly v porovnání s druhými dvěma metodami poměrně široké základny, také retenční časy kyseliny askorbové u metod 3 a 4 byly asi o minutu delší, než v případě metod 1 a 2. Při posouzení jednotlivých parametrů, byla metoda č. 1 ohodnocena jako nejvhodnější.

Tabulka č. 11: Srovnání hodnot kyseliny askorbové naměřených jednotlivými metodami

název odrůdy	množství k. askorbové (mg.100 g <sup>-1</sup> )					poměry			
	1	2	3	4	[10]	2/1	3/1	4/1	[10]/1
Kyjevský	262,14	226,84	373,94	274,58	97,19	0,87	1,43	1,05	0,37
Vitamínová	165,10	101,72	174,47	180,79	97,53	0,62	1,06	1,10	0,59
Leicora	245,30	217,56	250,88	282,96	143,69	0,89	1,02	1,15	0,59
Olejová	186,84	144,02	192,53	203,92	56,57	0,77	1,03	1,09	0,30

Jako referenční byly zvoleny hodnoty naměřené metodou 1. Srovnáním hodnot množství kyseliny askorbové (viz. tabulka č. 11) vyplývá, že systémy s mobilní fází v podobě kyseliny šťavelové poskytují nepatrně vyšší výsledky, než v případě mobilní fáze složené z fosfátového pufru a methanolu. Větší hodnoty plochy píků mohou být způsobeny širokými základnami píků, kterými se vyznačují právě metody 3 a 4.

Určitou pozitivní chybu do měření mohl vnést i způsob přípravy, kdy se rozmělněné plody převedly do odměrné baňky a roztok byl doplněn po rysku. V daném objemu tuhé části zaujímaly určitý objem, který mohl ovlivnit výsledek. Proto také byl zhotoven kontrolní vzorek do 100 ml odměrné baňky a proměřen metodou č. 3, avšak nebyly shledány významné rozdíly v množství kyseliny askorbové. Při rozpuštění ve 100 ml bylo naměřeno množství vitamínu C rovnající se 285 mg ve 100 g plodů a při rozpuštění v 25ml odměrné baňce 373,94 mg.100 g<sup>-1</sup>. Rozdíl v množství kyseliny askorbové sice byl nalezen, ale vzhledem k tomu, že se hodnota značně odlišovala od průměru hodnot dosažených u jiných odrůd, nebyl rozdíl shledán za významný.

#### 4.1.2.5 Výtěžnost

Příprava roztoků a postup experimentu je uveden v kapitole 3.4.3.2.

U jednotlivých vzorků byly zpozorovány velké rozdíly, které mohly vzniknout především nestejnoměrným nanesením přídatku kyseliny askorbové na dužninu plodů. Na množství mohl mít vliv čas, po který druhý vzorek čekal na zpracování. Proto také bylo vždy u jednoho vzorku ze tří zaměněno pořadí (napřed vzorek 2 a pak 1). U těchto vzorků byly hodnoty výtěžnosti vždy vyšší.

Vzhledem k velkým rozdílům mezi jednotlivými dílčími výsledky bude potřeba vypracovat jiný postup stanovení výtěžnosti.

Tabulka č. 12: Srovnání výtěžnosti metod 1 a 3 (v %)

metoda	Kyjevský			Leicora			průměr
	1	2	3	1	2	3	
1	94	100	66	60	159	91	95
3	88	98	82	68	76	113	88

## 4.2 Úprava rostlinných matric pro analýzu

V této části bylo za úkol stanovit nejvhodnější způsob přípravy vzorků k analýze.

Jednotlivé pracovní postupy pro každý způsob úpravy matric jsou uvedeny v kapitole 3.5.

### 4.2.1 Úprava kdoulí pro analýzu

Způsob přípravy kdoulí pro analýzu, který využíval k rozmělnění struhadlo byl zdlouhavý. Po nastrohání bylo porušené pletivo dlouho vystaveno vzdušnému kyslíku a světlu, což mohlo mít vliv na množství vitamínu C.

Oproti tomu mělo mixování výhodu, že vzorek byl při porušování tkáně ponořen do extrakčního činidla, což mohlo zajistit větší stabilitu.

Odpovídalo tomu i stanovené množství vitamínu C, jehož rozdíl mezi oběma postupy činil více než 10 %. Lepší extrakci kyseliny askorbové poskytla úprava kdoulí mixérem.

### 4.2.2 Úprava rakytníků pro analýzu

#### *Filtrace*

Při prvním způsobu filtrace byl nevýhodou dlouhý čas přípravy. Filtrace i pod vývěvou probíhala velice pomalu. Ke ztrátám vitamínu C mohlo dojít nedostatečnou extrakcí, vystavením roztoku oxidačním podmínkám (světlo, kyslík,...) a v neposlední řadě zachycením roztoku na filtračním papíře.

Druhý způsob byl rychlejší, vzorek nebyl tolik vystaven oxidačním podmínkám a ztráty objemu roztoku byly minimální. Přesto možnou nevýhodou tohoto postupu může být objem, který zaujímají tuhé části plodu v odměrné baňce, což může způsobit určitou pozitivní chybu. Pro její eliminaci by mohlo pomoci používat odměrné baňky s větším objemem, kde by poměr kapaliny k tuhým částím nebyl tak vysoký, avšak je zde nevýhodou velká spotřeba extrakčního činidla.

#### *Extrakční činidlo*

Při testování různých systémů byly prověřeny i dvě extrakční činidla. U vzorků extrahovaných 2% kyselinou šťavelovou byl nalezen pokles hodnot plochy píků v průběhu 3 nástríků jednoho vzorku – viz kapitola 4.1.2.5 a Tabulka č. 9. Vzorky rakytníku extrahované pomocí kyseliny šťavelové byly více zakaleny i po přefiltrování narozdíl od kyseliny monohydrogenfosforečné. Na stěnách odměrné baňky také vzlínal tenký mastný film, který mohl vzniknout kyselou hydrolýzou olejů přítomných v dužině.

#### *Doba prodlení u extrakce*

Bylo zkoumáno, zda na množství extrahovaného vitamínu C má vliv i doba extrakce. V následující tabulce č. 13 jsou shrnuty množství kyseliny askorbové (AA) v závislosti na době extrakce. Rozdíl v době prodlení před filtrací vzorku byl pozorovatelný, ale vzhledem k počtu vzorků málo významný. Aby bylo možno s jistotou říci, že pětiminutová prodleva zvyšuje výtěžek extrakce, bylo by nutné experiment opakovat s větším počtem měření.

Tabulka č. 13: Množství kyseliny askorbové v závislosti na délce extrakce

<b>doba prodlení u extrakce (min)</b>	<b>množství AA (mg.100 g<sup>-1</sup>)</b>
0	262,14
5	267,55
10	258,14
15	254,77

#### ***Omezený přístup světla, tepla***

Běžným postupem bylo stanoveno množství vitamínu C v odrůdě Kyjevský na 262,14 mg.100 g<sup>-1</sup>. Při omezeném přístupu světla a při práci s vychlazenými roztoky a pomůckami bylo ve vzorku nalezeno 243,64 mg.100 g<sup>-1</sup> plodů, což je méně. Pro pozorování znatelného rozdílu mezi vzorky by bylo třeba proměřit více vzorků a důsledněji dodržovat omezený přístup světla a tepla použitím tmavého skla a prací při nízké teplotě a sníženém osvětlení, čehož v běžných laboratorních podmínkách nelze dosáhnout. Obalení v hliníkové folii sice umožnilo lepší tepelnou izolaci, avšak proti světlu vzhledem ke své lesklosti mnoho nechránilo.

### **4.3 Stanovení vitamínu C v plodech vybraných druhů ovoce**

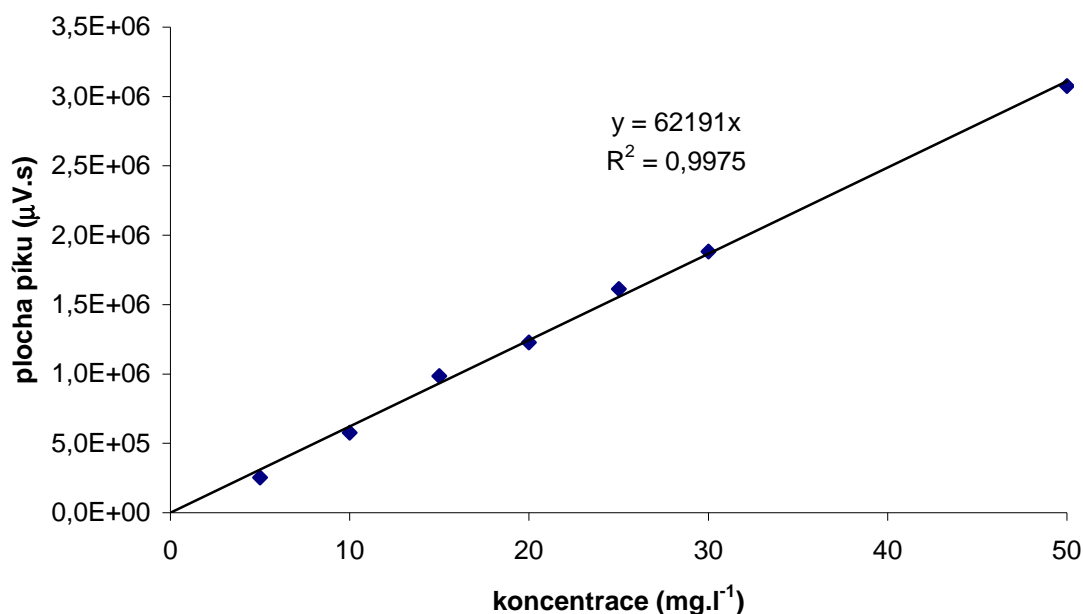
#### **4.3.1 Vitamin C v kdoulích**

##### ***Sestrojení kalibrační závislosti***

Pracovní postup k přípravě jednotlivých roztoků kalibrační křivky je uveden v kapitole 3.6.2.

Tabulka č. 14: Kalibrační křivka

<b>koncentrace (mg.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>plocha píku (μV.s)</b>
5	254 000
10	576 000
15	986 000
20	1 228 000
25	1 613 000
30	1 883 000
50	3 076 000

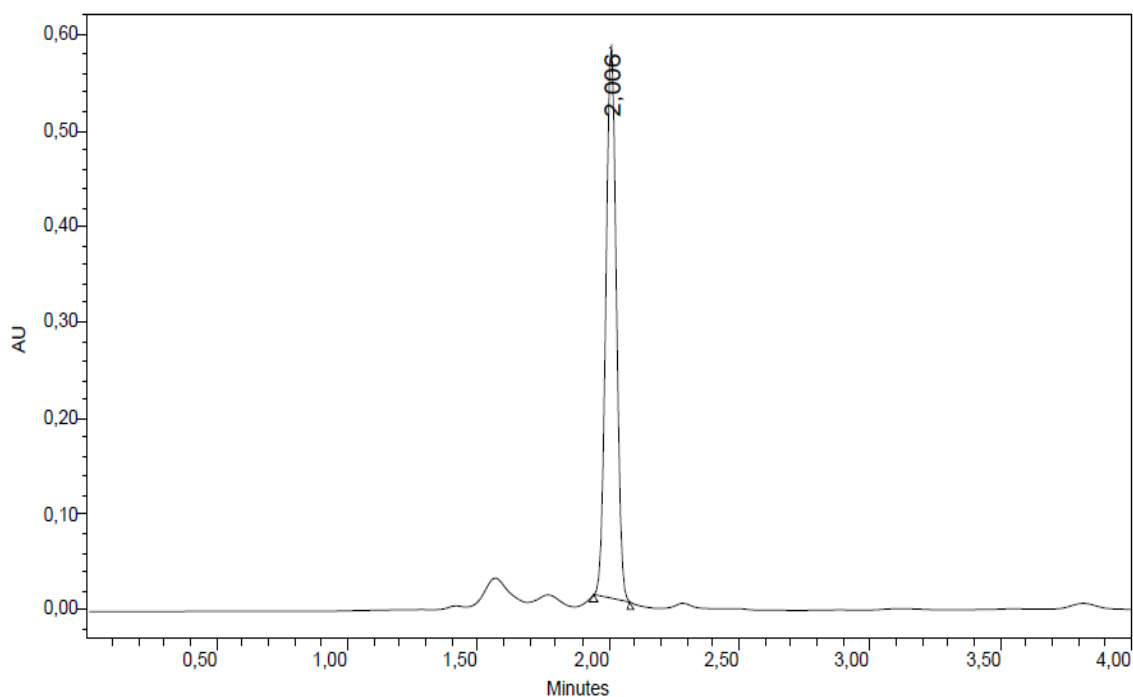


Obr. č. 20: Kalibrační křivka

Ve studovaném koncentračním rozsahu je závislost lineární. Korelační koeficient svou hodnotou nad 0,99 značí velmi dobrou linearitu.

#### **Stanovení vitamínu C ve vybraných odrůdách plodů kdouloně**

Příprava vzorků kdoulí pro analýzu je zmíněna v kapitole 3.6.2. Analýza trvala 4 minuty, kyselina askorbová eluovala ve 2. minutě. Po analýze byla kolona 11 minut proplachována mobilní fází z důvodu vymytí dalších detekovaných látek, které by mohly ovlivňovat následující analýzu.



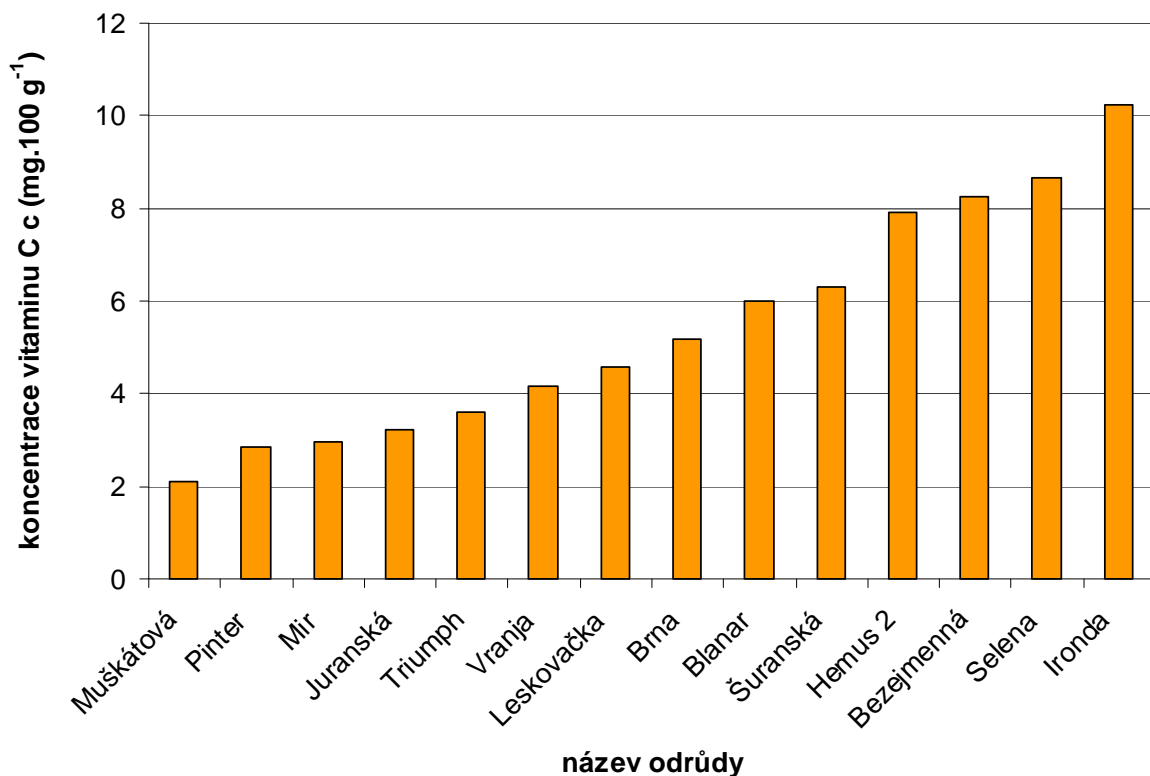
Obr. č. 21: Chromatogram vzorku odrůdy Blanař.

Tabulka č. 15: Naměřené hodnoty z vzorků odrůdy Blanar.

navážka (g)	plocha píků ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )				množství AA	
	nástřik 1	nástřik 2	nástřik 3	průměr	( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )
19,825	1 453 782	1 448 064	1 364 457	1 422 101	22,87	5,77
21,206	1 721 141	1 585 511	1 625 745	1 644 132	26,44	6,23

Tabulka č. 16: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách kdoule seřazené dle množství vitamínu C

název odrůdy	koncentrace vitamínu C ( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )		
	vzorek 1	vzorek 2	průměr
Muškatová	1,87	2,35	2,11
Pinter	2,40	3,30	2,85
Mir	3,53	2,40	2,96
Juranská	3,48	2,96	3,22
Triumph	4,04	3,15	3,59
Vranja	3,84	4,45	4,14
Leskovačka	3,98	5,14	4,56
Brna	4,89	5,43	5,16
Blanar	5,77	6,23	6,00
Šuranská	5,90	6,72	6,30
Hemus 2	7,53	8,32	7,92
Morava	8,27	8,24	8,26
Selena	8,00	9,31	8,65
Irona	12,56	7,92	10,24



Obr. č. 22: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách kdoulí

Hodnoty vitamínu C v analyzovaných plodech čtrnácti vybraných odrůd kdouloně obecné sbírané na podzim 2008 se pohybovaly v rozmezí přibližně 2–10 mg kyseliny askorbové ve 100 g plodů. Nejvyšší množství vitamínu C bylo nalezeno v odrůdě Ironda (10,24 mg ve 100 g plodů). Další tři odrůdy s poměrně vysokým množstvím vitamínu C byly Selená (8,65 mg. 100 g<sup>-1</sup>), Morava (8,26 mg. 100 g<sup>-1</sup>) a Hemus 2 (7,92 mg. 100 g<sup>-1</sup>). Odrůdou s nejnižším množstvím vitamínu C byla odrůda Muškátová s hladinou kyseliny askorbové dosahující k 2,11 mg ve 100 g plodů.

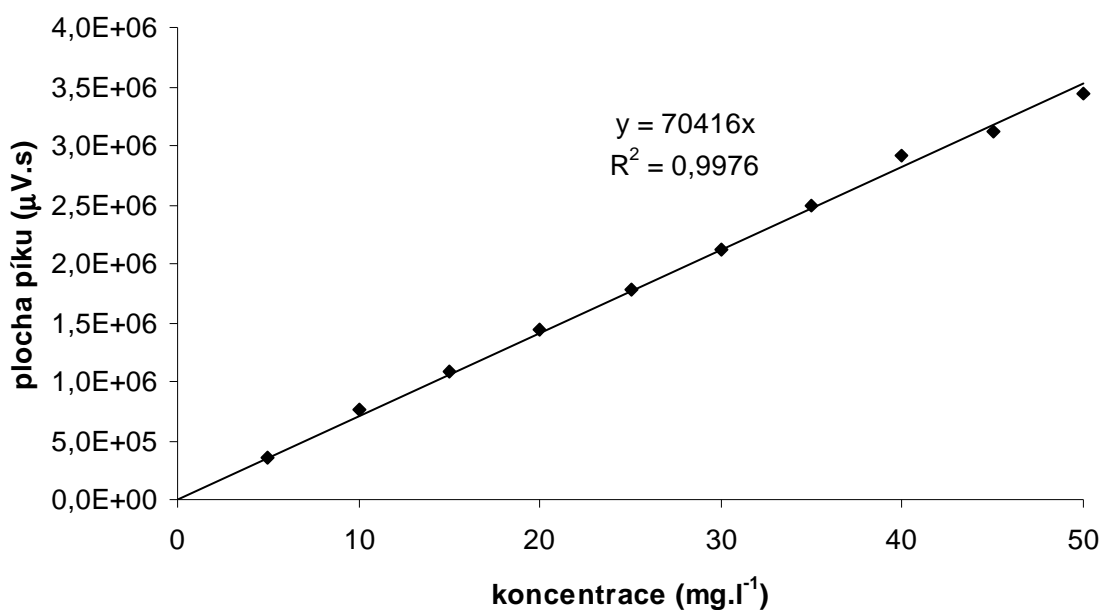
#### 4.3.2 Vitamin C v rakytníku řešetlákovém

##### *Sestrojení kalibrační závislosti*

Pracovní postup k přípravě dílčích roztoků kalibrační křivky je zmíněn v kapitole 3.6.3.

Tabulka č. 17: Kalibrační křivka

<b>koncentrace</b> (mg.l <sup>-1</sup> )	<b>plocha píku</b> (μV.s)
5	359 000
10	760 000
15	1078 000
20	1 441 000
25	1 776 000
30	2 114 000
35	2 485 000
40	2 909 000
45	3 121 000
50	3 435 000



Obr. č. 23: Kalibrační křivka

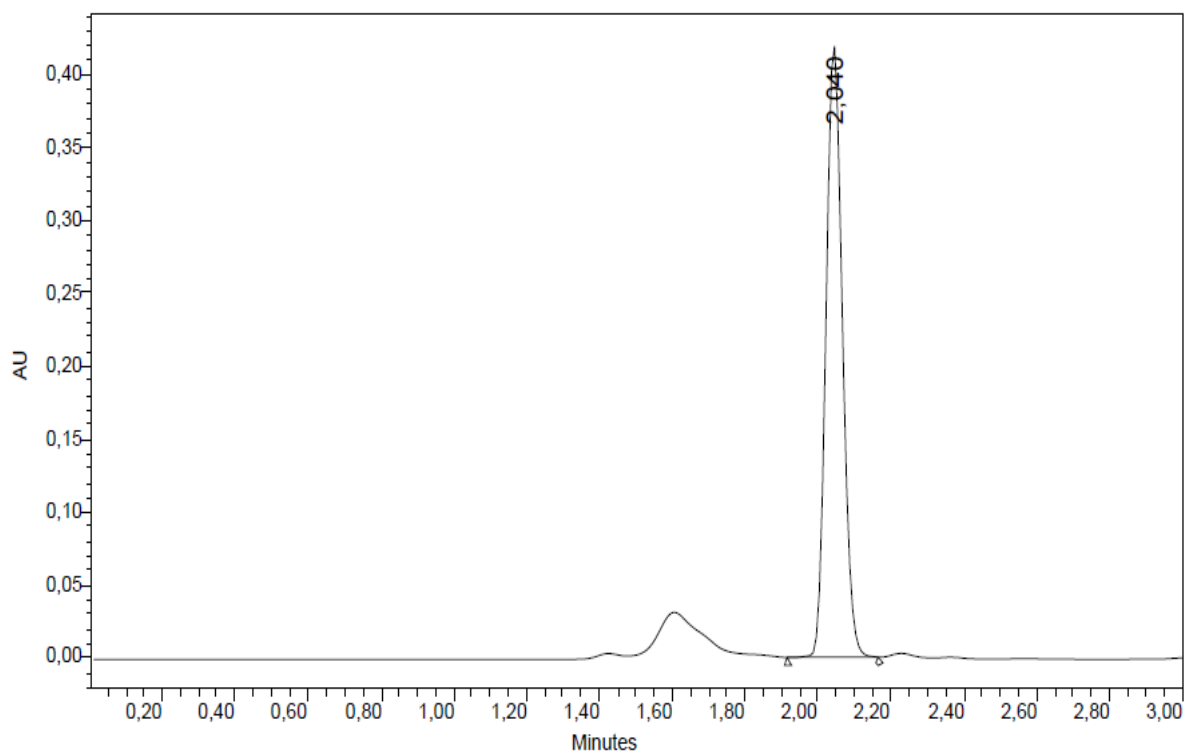
Ve studovaném koncentračním rozsahu je závislost lineární. Korelační koeficient svou hodnotou nad 0,99 značí velmi dobrou linearitu.

### **Stanovení vitamínu C ve vybraných odrůdách plodů rakytníku**

Popis přípravy vzorků rakytníku je uveden v kapitole 3.6.3.

Analýza jednoho nástřiku trvala 3 minuty – retenční čas kyseliny askorbové byl 2,04 minuty. Z každé odrůdy byly připraveny tři vzorky a každý z nich byl do systému nastříknut 3krát.

Soubor výsledků je uveden v tabulce č. 19 a na obr. č. 25. Tabulka č. 18 znázorňuje dílčí výsledky jednoho měření a na obrázku č. 24 je zachycen chromatogram kyseliny askorbové v odrůdě Kyjevský.



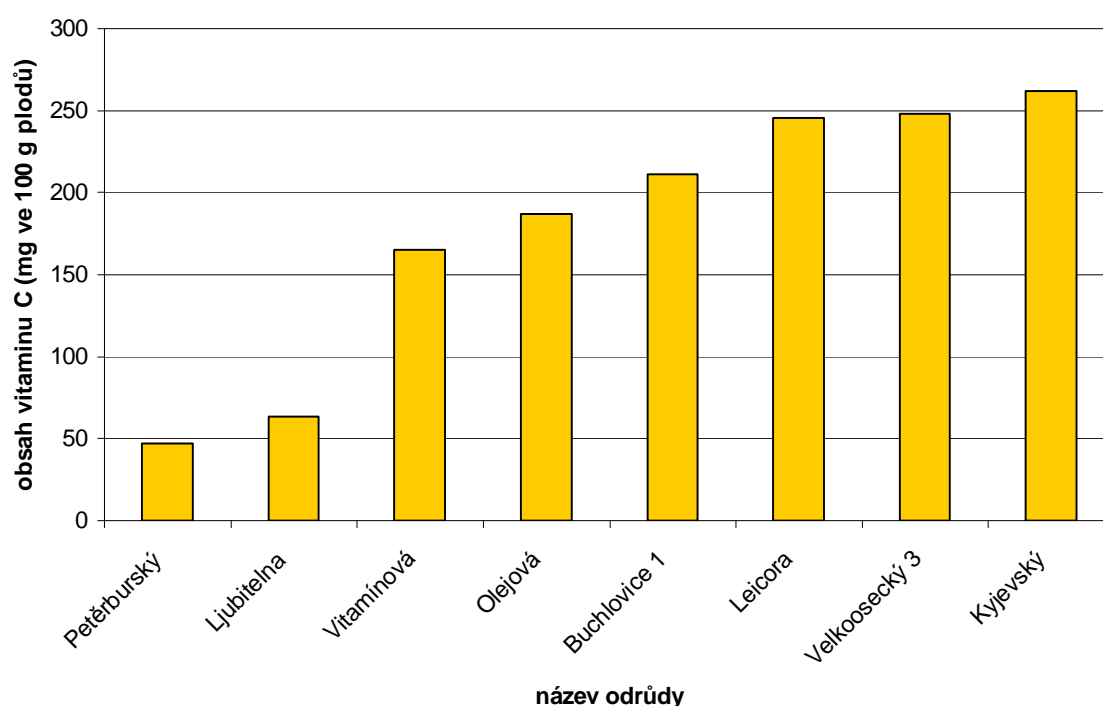
*Obr. č. 24: Chromatogram vzorku odrůdy Kyjevský*

*Tabulka č. 18: Stanovené hodnoty vzorků z odrůdy Kyjevský*

navážka (g)	plocha píků ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )				množství AA	
	nástřik 1	nástřik 2	nástřik 3	průměr	( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )
4,0537	1 367 779	1 358 099	1 319 658	1 348 512	19,15	295,26
4,3885	1 191 395	1 235 724	1 197 433	1 208 184	17,16	244,36
4,3713	1 220 953	1 216 265	1 209 231	1 215 483	17,26	246,80

Tabulka č. 19: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách rakytníku řešetlákového sbíraných na podzim 2006

název odrůdy	množství vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )			
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	průměr
Petěrbuský	50,61	52,61	38,49	47,24
Ljubitelna	58,52	64,22	68,35	63,70
Vitamínová	172,38	157,44	165,47	165,10
Olejová	197,26	181,64	181,62	186,84
Buchlovice 1	215,92	202,01	214,61	210,85
Leicora	240,03	242,90	252,98	245,30
Velkoosecký 3	239,35	255,00	249,63	247,99
Kyjevský	295,26	244,36	246,80	262,14



Obr. č. 25: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách rakytníku řešetlákového sbíraných na podzim roku 2006

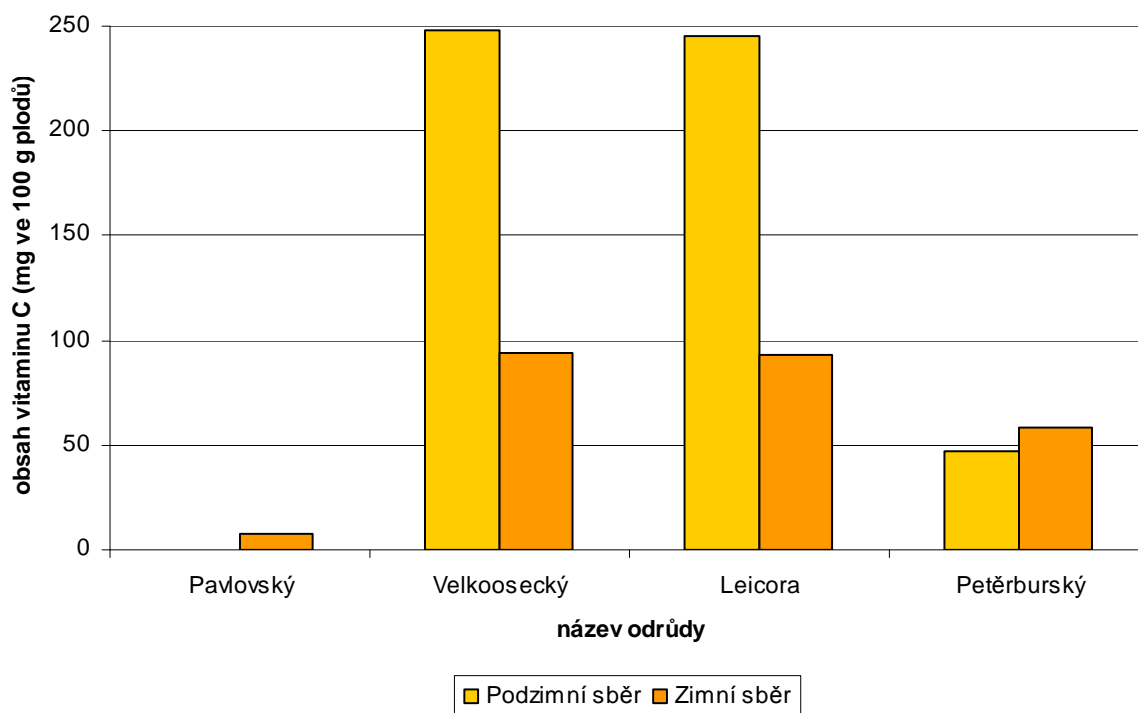
Vitamin C byl stanovován v plodech osmi různých odrůd rakytníku řešetlákového, jejichž sběr byl uskutečněn na podzim roku 2006 (viz. Příloha č. 2). Do doby než proběhl experiment, byly plody uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C. Naměřený obsah kyseliny askorbové se pohyboval od 47 do 262 mg na 100 g plodů. Nejvyšší hladiny vitamínu C dosáhla ruská odrůda Kyjevský s 262,14 mg ve 100 g plodů. Další dvě odrůdy s poměrně vysokým množstvím vitamínu C byly odrůdy Velkoosecký 3 (247,99 mg.100 g<sup>-1</sup>) a německá Leicora (245,30 mg. 100 g<sup>-1</sup>). Nejnižší hodnoty byly nalezeny u odrůd Petěrbuský (47,24 mg.100 g<sup>-1</sup>) a Ljubitelna (63,7 mg.100 g<sup>-1</sup>).

Pro experiment byly kromě vzorků z roku 2006 použity i čerstvé vzorky ze zimního sběru v roce 2008 (viz. Příloha č. 3). Porovnáním výsledků (viz. graf na obrázku č. 26) s hodnotami naměřenými na odrůdách podzimního sběru byl pozorován značný úbytek vitamínu C. Tabulka č. 20 shrnuje výsledky jednotlivých extraktů odrůd ze zimního sběru.



Tabulka č. 20: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách rakytníku řešetlákového sbíraných v zimě roku 2008

název odrůdy	množství vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )			
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	průměr
Leicora	97,41	89,84	91,18	92,81
Petěrburský	63,32	53,53	59,14	58,66
Velkoosecký	87,54	88,98	106,05	94,19
Pavlovský	6,45	9,11	7,81	7,79



Obr. č. 26: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách rakytníku řešetlákového – srovnání (u odrůdy Pavlovský nebyl proveden podzimní sběr)

Hodnoty vitamínu C v plodech sbíraných v zimě 2008 se pohybují v rozmezí přibližně 7–94 mg.100 g<sup>-1</sup>. Nejvyšší hodnoty dosahuje odrůda Velkoosecký (94,19 mg.100 g<sup>-1</sup>) a nejnižší Pavlovský (7,79 mg.100 g<sup>-1</sup>). V grafu na obrázku č. 26 je znázorněno srovnání podzimního a zimního sběru. I když plody sbírané na podzim byly skladovány po 2 roky v mrazničce, bylo množství vitamínu C u dvou odrůd značně vyšší než u zimního sběru. Na rozdíl hodnot se mohlo podílet také odlišné klima při dozrávání plodů, jelikož plody nebyly sbírány ve stejném roce. Avšak vzhledem k tomu, že rozdíly byly poměrně vysoké, lze usoudit, že množství vitamínu C v plodech od podzimu do zimy značně ubývá. Na úbytek vitamínu C má vliv především světlo, teplota, tkáňové enzymy a další. Je tedy vhodnější rakytník sbírat ještě na podzim.

## 5 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce shrnuje informace o rakytníku řešetlákovém (*Hippophae rhamnoides*, L.) a kdouloni obecné (*Cydonia oblonga*, Mill.). Zabývá se popisem rostlin, obsahem zdravotně významných látek a jejich využitím. V dalších kapitolách jsou zmíněny informace o vitaminu C a o jeho stabilitě, extrakci a stanovení především pomocí metody HPLC v potravinách a jiných biologických matricích.

Cílem experimentální části bylo vybrat vhodnou kolonu a separační systém pro stanovení vitaminu C v různých odrůdách obou druhů méně známého ovoce, stanovit vhodnou přípravu vzorků pro analýzu a konečně zanalyzovat jednotlivé odrůdy ovoce. Z testovaných šesti kolon byla vybrána kolona Gemini C18 s rozměry 150 x 4,6 mm a s průměrem částic 5  $\mu\text{m}$ . Na koloně byly vyzkoušeny analýzy ve dvou různých systémech. První sestával z extrakčního činidla 2% kyseliny šťavelové a z mobilní fáze 0,01 M roztoku kyseliny šťavelové. Systém, ve kterém byly nakonec analyzovány vzorky ovoce, obsahoval v mobilní fázi 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 100 ml methanolu rozpuštěných v 900 ml redestilované vody. Jako extrakční činidlo byla použita 2% kyselina monohydrogenfosforečná. U těchto dvou systémů byla u vybraných odrůd rakytníku řešetlákového stanovována výtěžnost kyseliny askorbové ze vzorku. Na těchto odrůdách byly rovněž vyzkoušeny kombinace použitých dvou extrakčních činidel a dvou mobilních fází.

U obou druhů zkoumaného ovoce byly testovány různé úpravy matric pro analýzu. Nejvhodnější příprava kdoulí k analýze se zdá být rozmixování vzorku v extrakčním činidle. Pro úpravu rakytníku je vhodná homogenizace tloučkem v třecí misce obsahující extrakční činidlo. U plodů rakytníku byl zkoumán i vliv doby extrakce na množství extrahovaného vitaminu C. Zdá se, že pro extrakci vitaminu C z matrice je dostačující doba 5 minut. Avšak pro verifikaci tohoto zjištění by bylo nutno provést ještě četnější soubor měření.

Stanovení vitaminu C v kdoulích bylo provedeno ve 14 odrůdách. Nejvyšší obsah vitaminu C měla odrůda Irona (10,24 mg.100 g<sup>-1</sup>), poměrně vysoké množství bylo nalezeno v odrůdách Selenia (8,65 mg. 100 g<sup>-1</sup>), Morava (8,26 mg. 100 g<sup>-1</sup>) a v odrůdě Hemus 2 (7,92 mg. 100 g<sup>-1</sup>). Nejnižší obsah byl stanoven v odrůdě Muškátová (2,11 mg.100 g<sup>-1</sup>).

Zvolenou metodou byly analyzovány plody osmi odrůd rakytníku řešetlákového z podzimního sběru z roku 2006 a čtyři odrůdy rakytníku sbírané v zimě roku 2008. Hodnoty vitaminu C ze zimního sběru byly daleko nižší než u podzimního sběru. Nejvyšší množství vitaminu C v podzimním sběru dosáhla odrůda Kyjevský (262,14 mg.100 g<sup>-1</sup>), nejnižší byla nalezena v odrůdě Petěrburský (47,24 mg.100 g<sup>-1</sup>). Poměrně vysoké hodnoty měly i odrůdy Velkoosecký 3 (247,99 mg.100 g<sup>-1</sup>) a Leicora (245,30 mg. 100 g<sup>-1</sup>). Nejvíce vitaminu C v plodech ze zimního sběru bylo v odrůdě Velkoosecký (94,19 mg.100 g<sup>-1</sup>) a nejméně v odrůdě Pavlovský (7,79 mg.100 g<sup>-1</sup>). Při porovnání hodnot stejných odrůd při jiném datu sběru bylo shledáno menší množství vitaminu C u zimního sběru.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ČSN EN 14130: 2004. Potraviny – Stanovení vitamínu C metodou HPLC. Praha: Český normalizační institut, 2004. 14 s.
- [2] Cetkovská, J. *Zdravotně významné látky v rakytníku řešetlákovém a jejich využití*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 40 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [3] Obrázek *Hippophae rhamnoides*. [cit. 27. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://www.schneckeninfo.de/FotosDVD/H/2733.jpg>>.
- [4] Keuck, G.: *Carl Axel Magnus Lindman: Builder ur Nordens Flora (1901–1905)* Součást Kurt Stübers online library [online]. Poslední revize: 28. dubna 1999 [cit. 27. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/lindman/243.jpg>>.
- [5] Vlastní fotografie
- [6] Oficiální stránky společnosti Zentiva, nabídka produktů [cit. 27. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://zentiva.cz/default.aspx/cz/cosmetics?type=detail&Kod=0000004>>.
- [7] Oficiální stránky firmy Ing. Pavel Cvrček, Úprava a zpracování rakytníku řešetlákového [cit. 21. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://www.rakytник.eu/>>.
- [8] Rakytník řešetlákový, nabídka produktu. [cit. 21. 4. 2009] Dostupné z: <[http://www.naturamedicahk.com/medica/2/page2a\\_cz.htm](http://www.naturamedicahk.com/medica/2/page2a_cz.htm)>.
- [9] Internetový obchod *Health in a Jiffy* [cit. 27. 4. 2009] Dostupné z: <<http://www.healthinajiffy.co.uk/weleda-organic-sea-buckthorn-juice-200ml-p-6847.html>>.
- [10] Dolejší, A., Kott, V., Šenk, L.: *Méně známé ovoce*. Praha: Zemědělské nakladatelství Brázda, 1991. 152 s. ISBN 80-209-0188-4.
- [11] Štveráková, G.: *Pěstování a růstová charakteristika vybraného souboru odrůd kdouloní (Cydonia oblonga Mill.)*. Lednice: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, 2008. 55 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Vojtěch Řezníček, CSc.
- [12] *Köhlers Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte*. Součást Kurt Stübers online library [online]. Poslední revize: 10. prosince 2001 [cit. 27. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/%7Estueber/koehler/QUITTE.jpg>>.
- [13] Alberts, A.; Mullen, P.; Spohn, M.: *Léčivé stromy a keře*. 1. vyd. Praha: Beta-Dobrovský, 2006. 247 s. ISBN 80-7306-230-5
- [14] Vencová, J.: *Hodnocení vybraného souboru odrůd, genotypů kdouloní (Cydonia oblonga Mill.)*. Lednice: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, 2006. 67 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Vojtěch Řezníček, CSc.
- [15] Oficiální stránky El Pelos.com [cit. 27. 4. 2009]. Dostupné z: <[http://www.elpelos.com/Botanica/Herbario\\_06-07/cydonia%20oblonga%20%5B640x480%5D.jpg](http://www.elpelos.com/Botanica/Herbario_06-07/cydonia%20oblonga%20%5B640x480%5D.jpg)>.

- [16] Adler, M.: Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) and its growing and economic descriptions. In Salaš, P.: *Proceedings of 9<sup>th</sup> International Conference of Horticulture, Lednice, 3.–6. září 2001*, Ed. P. Salaš., 2001, s. 3–7. ISBN 80-7157-524-0
- [17] Forgacs, K.; Jodal, I.; Kandra, L.; Wagner, H.; Nanasi, P.: Water-soluble polysaccharides in the seeds of the quince tree (*Cydonia oblonga*). *ACH – Models in Chemistry*, 1998, roč. 135, č. 6, s. 953–959. ISSN 1217-8969
- [18] Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Goncalves, A. C.; Seabra, R. M.; Oliveira, M. B.; Ferreira, M. A.: Influence of jam processing upon the content of phenolics, organic acids and free amino acids in quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller). *European Food Research and Technology*, 2004, roč. 218, č. 4, s. 385–389, ISSN 1438- 2377
- [19] Hamauzu, Y.; Yasui, H.; Inno, T.; Kume, C.; Omanyuda, M.: Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, roč. 53, č. 4, s. 928–934. ISSN 0021-8561.
- [20] Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Ferreres, F.; Seabra, R. M.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, M. A.: Composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: Phenolics, organic acids and free amino acids. *Natural Product Research*, 2005, roč. 19, č. 3, s. 275–281. ISSN 1478-6419
- [21] Obrázek *Cydonia oblonga* [27. 4. 2009]. Dostupné z: [http://1.bp.blogspot.com/\\_dB-mALovr2s/RctZ\\_0MYBGI/AAAAAAAAAGE/Himzk9F3mNA/s400/](http://1.bp.blogspot.com/_dB-mALovr2s/RctZ_0MYBGI/AAAAAAAAAGE/Himzk9F3mNA/s400/)
- [22] Oficiální stránky společnosti Rudolf Jelínek, nabídka produktů [cit. 21. 4. 2009] Dostupné z: <<http://www.rjelinek.cz/produkty.php?produkt=27&name=Kdoule>>.
- [23] Oficiální stránky společnosti Oxalis, nabídka produktů [cit. 25. 4. 2009] Dostupné z: <<http://www.teaandcoffeexalis.com/exec/search.asp?EXPS=kdoule&SearchType=Fulltext>>.
- [24] Oficiální stránky společnosti B. J. Vitis, nabídka produktů [cit. 21. 4. 2009] Dostupné z: <<http://www.bj-vitis.cz/katalogdetail.php?id=14>>.
- [25] Internetový obchod, produkty firmy Logona [cit. 21. 4. 2009] Dostupné z: <[http://www.edenshop.cz/logona/logona-ocni-gel-aloe-kdoule-pro-suchou-i-citlivou-plet-prod\\_1258.html](http://www.edenshop.cz/logona/logona-ocni-gel-aloe-kdoule-pro-suchou-i-citlivou-plet-prod_1258.html)>.
- [26] Fennema, O. R.: *Food chemistry*. 3. vyd. New York Marcel Dekker, Inc., 1996. 1069 p. ISBN 0-8247-9691-8
- [27] Velíšek, J.: *Chemie potravin 2*. 1.vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5
- [28] Pánek, J., Pokorný, J., Dostálová, J.: *Základy výživy a výživová politika*. 1.vyd.. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 219 s. ISBN 80-7080-468-8
- [29] Henry, C. J. K., Chapman, C.: *Nutrition Handbook for Food Processors*. Woodhead Publishing, 2002. 416 p. ISBN 1-59124-430-7. [cit. 26. 2. 2007] Dostupný z: <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=651&VerticalID=0>

- [30] Nováková, L.; Solich, P.; Solichová, D.: HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, roč. 27, č. 10, s. 942–958. ISSN 0165-9936
- [31] Tiitinen, K.M., Yang, B., Haraldsson, G. G., Jonsdottir, S., Kallio, H. P.: Fast Analysis of sugars, fruit acids, and vitamin C in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, roč. 54, č. 7, s. 2508-2513. ISSN 0021-8561.
- [32] Serpen, A.; Gökmen, V.; Bahceci, K. S.; Acar, J.: Reversible degradation kinetics of vitamin C in peas during frozen storage. *European Food Research and Technology*, 2007, roč. 224, č. 6, s. 749–753, ISSN 1438-2385
- [33] Nollet, L. M. L.: *Food Analysis by HPLC*. 2. vyd. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. 1049 s. ISBN 0-8247-8460-X.
- [34] Rizzolo, A.; Brambilla, A.; Valsecchi, S.; Eccher-Zerbini, P.: Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear fruit tissue. *Food Chemistry*, 2002, roč. 77, č. 2, s. 257–262. ISSN 0308-8146
- [35] Serpen, A.; Gökmen, V.: Reversible degradation kinetics of ascorbic acid under reducing and oxidizing conditions. *Food Chemistry*, 2007, roč. 104, č. 2, s. 721–725. ISSN 0308-8146
- [36] Klimczak, I.; Malecka, M.; Szlachta, M.; Gliszczynska-Świgło, A.: Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, roč. 20, č. 3-4, s. 313–322. ISSN 0889-1575.
- [37] Sánchez-Mata, M. C.; Cámara-Hurtado, M.; Díez-Marqués, C.; Torija-Isasa, M. E.: Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research and Technology*, 2000, roč. 210, č. 3, s. 220–225, ISSN 1438-2377.
- [38] Kall, M. A.; Andersen, C.: Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography B*, 1999, roč. 730, č. 1, s. 101–111, ISSN 1570-0232.
- [39] Hernández, Y.; Lobo, M. G.; González, M.: Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 2006, roč. 96, č. 4, s. 654–664, ISSN 0308-8146
- [40] Nojavan, S.; Khalilian, F.; Kiaie, F. M.; Rahimi, A.; Arabanian, A.; Chalavi, S.: Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, roč. 21, č. 4, s. 300–305. ISSN 0889-1575.
- [41] Deutsch, J. C.: Dehydroascorbic acid. *Journal of chromatography A*, 2000, roč. 881, č. 1-2, s. 299–307, ISSN 0021-9673.

- [42] Burini, G.: Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 2007, roč. 1154, č. 1-2, s. 97–102, ISSN 0021-9673.
- [43] Ihara, H.; Matsumoto, N.; Shino, Y.; Aoki, Y.; Hashizuma, N.; Nanba, S.; Urayama, T.: An automated assay for measuring serum ascorbic acid with use of 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy, free radical and o-phenylenediamine. *Clinica Chimica Acta*, 2000, roč. 301, č. 1-2, s. 193 – 204. ISSN 0009-8981
- [44] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [45] Volka, K.: *Analytická chemie II*. 1.vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8
- [46] Günzler, H.; Williams, A.: *Handbook of Analytical Techniques*. Weinheim: WILEY-WCH, 2001. 1198 s. ISBN 3-527-30165-8
- [47] Douša, M.: Oficiální stránky o HPLC [online], 1999-2009, last modified: 15. 4. 2009 Dostupné z: <<http://www.hplc.cz>>.
- [48] Krejčí, M.; Pajurek, J.; Komers, R.: *Výpočty a veličiny v sorpční kolonové chromatografii*. Praha: SNTL, 1990. 208 s. ISBN 80-03-00403-9.
- [49] Palová, P.: *Stanovení obsahu vitamínu C v plodech dřínu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 67 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [50] Endstrasserová, J.: *Možnosti stanovení vitamínu C v rakytníku řešetlákovém (Hippophae rhamnoides, L.)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 91 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- [51] Fontannaz, P.; Kilinc, T.; Heudi, O.: HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry*, 2006, roč. 94, č. 4, s. 626–631. ISSN 0308-8146
- [52] Odriozola-Serrano, I.; Hernández-Jover, T.; Martín-Belloso, O.: Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food chemistry*, 2007, roč. 105, č. 3, s. 1151–1158. ISSN 0308-8146
- [53] Guliyev, V. B., Gul, M., Yildirim, A.: Hippophae rhamnoides L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *Journal of chromatography B*, 2004, č. 812, s. 291-307, ISSN 1570-0232.
- [54] Wall, M. M.: Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (Musa sp.) and papaya (Carica papaya) cultivars grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, roč. 19, č. 5, s. 434–445. ISSN 0889-1575.
- [55] Comesana, M.; García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J.: Control of nutritional labels in beverages with added vitamins: screening of  $\beta$ -carotene and ascorbic acid contents. *Food Chemistry*, 2002, roč. 79, č. 2, s. 141–144. ISSN 0308-8146

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

NADPH	(reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) – redukovaná forma nikotiamidadenindinukleotidfosfátu
RP-HPLC	(reverse phase – high performance liquid chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
LDL	(low density lipoproteins) – lipoproteiny s nízkou hustotou
HPLC	(high performance liquid chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	(liquid chromatography) – kapalinová chromatografie
GC	(gas chromatography) – plynová chromatografie
MS	(mass spectrometry) – hmotnostní spektrometrie
DAD	(Diode-array detector) – detektor s diodovým polem
ECD	(electrochemical detector) – elektrochemický detektor
UV	(ultraviolet) – ultrafialový
CO <sub>2</sub> -SFE	(CO <sub>2</sub> supercritical fluid extraction) – CO <sub>2</sub> superkritická fluidní extrakce
TMS	trimethylsilyl
DTT	dithiothreitol
DHAA	(dehydroascorbic acid) – dehydroaskorbová kyselina
AA	(ascorbic acid) – askorbová kyselina
UVB	(ultraviolet B) – ultrafialové záření B
O/V	typ emulze olej ve vodě
UHT	(ultra high temperature) – technologie konzervace záhřevem na vysoké teploty
EDTA	(ethylenediaminetetraacetic acid) – ethylendiamintetraoctová kyselina
PS/DVB	polystyren-divinylbenzen
HILIC	(Hydrophilic interaction liquid chromatography) – Kapalinová chromatografie založena na hydrofilních interakcích
TCEP	<i>tris</i> (2-carboxyethyl)phosphine
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
LLC	(liquid-liquid chromatography) – kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	(liquid-solid chromatography) – kapalinová adsorpční chromatografie
NPC	(normal phase chromatography) – chromatografie s normální fází
RPC	(reversed phase chromatography) – chromatografie s reverzní fází
RP-LC	(reverse phase – liquid chromatography) – kapalinová chromatografie s reverzními fázemi

## **SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha č. 1 Vzorky plodů analyzovaných odrůd kdouloně
- Příloha č. 2 Vzorky plodů analyzovaných odrůd rakytníku – sběr podzim 2006
- Příloha č. 3 Vzorky plodů analyzovaných odrůd rakytníku – sběr zima 2008
- Příloha č. 4 Přehled extrakčních technik pro stanovení vitamínu C v potravinách a biologických vzorcích
- Příloha č. 5 Podmínky analýzy při stanovení vitamínu C v různých potravinách a biologických vzorcích



## PŘÍLOHY

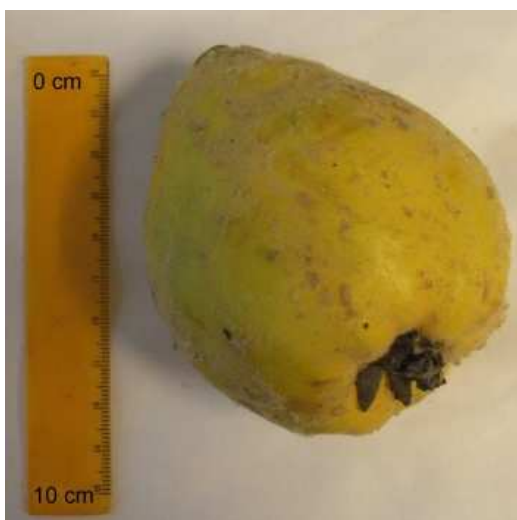
### Příloha č.1 – Vzorky plodů analyzovaných odrůd kdouloně

Plody byly sklizeny na podzim roku 2008 a do analýzy v únoru 2009 byly skladovány ve tmě a chladu. Snímky byly pořízeny před měřením.

#### Morava

Plody mají kulovitý nepravidelný tvar s žebry. Průměrná hmotnost plodů je 483,4 g. Pod zelenožlutou hladkou lesklou tečkovanou a mírně plstnatou slupkou se skrývá žlutozelená šťavnatá a hrubozrnná dužnina kyselé chuti bez tříslavin. [14]

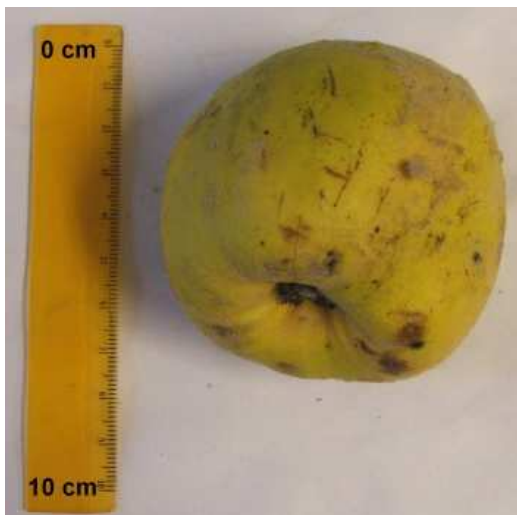
Váha analyzovaného plodu byla 199,5 g.



#### Blanar

Mají široce vejčitý, žebnatý tvar. Průměrná hmotnost plodu se pohybuje okolo 282 g. Slupka je zelenavě žlutá, hladká, pololesklá bez plstnatosti. Dužnina je zelenožluté barvy, tuhé konzistence a kyselé a šťavnaté chuti. [14]

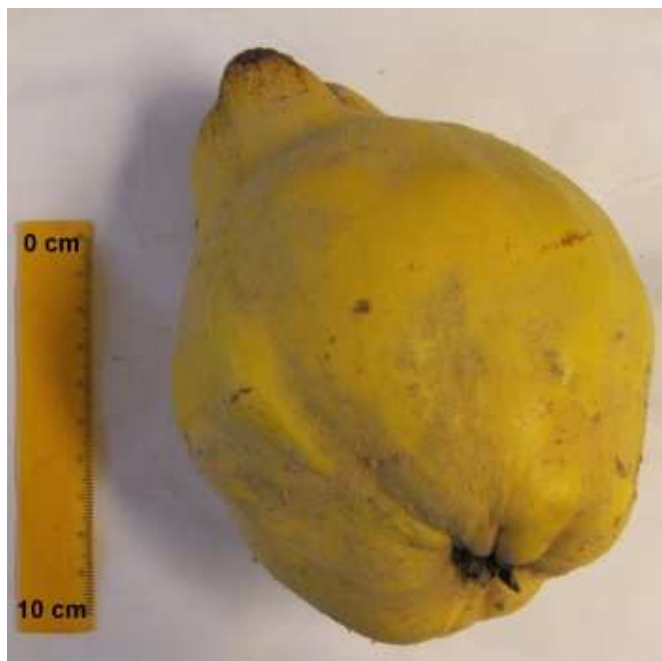
Váha analyzovaného plodu byla 224,5 g.



### **Brna**

Tvar plodu je vysoce kulovitý až hruškovitý s výrazným žebrovaním. Váží 562,1 g. Pod žlutou, hladkou, matou a mírně plstnatou slupkou se nachází běložlutá, tuhá dužnina nakyslé chuti. [14]

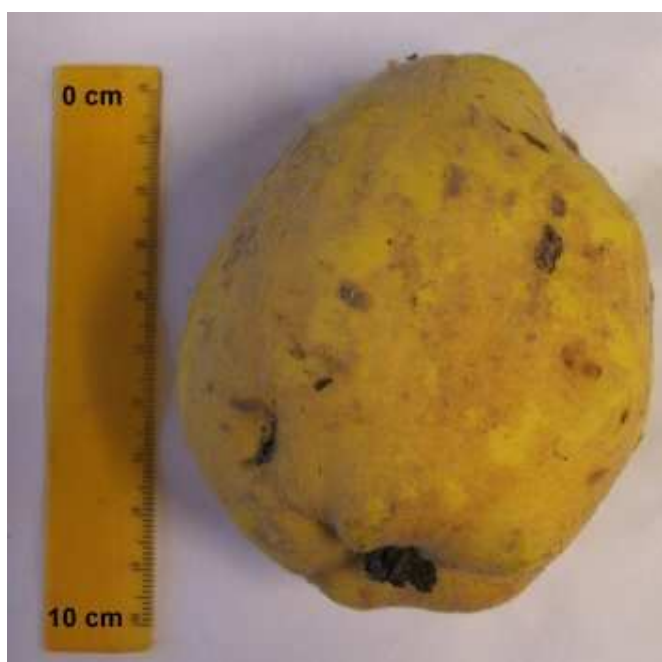
Váha analyzovaného plodu byla 602,17 g.



### **Hemus 2**

Tato odrůda je protáhle hruškovitá s výrazně protáhlou a úzkou stopečnou částí. Váha se pohybuje okolo 407,3 g. Slupka je jasně žlutá, hladká, lesklá a mírně plstnatá. Dužnina je nažloutlé barvy, tuhé konzistence a nakyslé a svíravé chuti. [14]

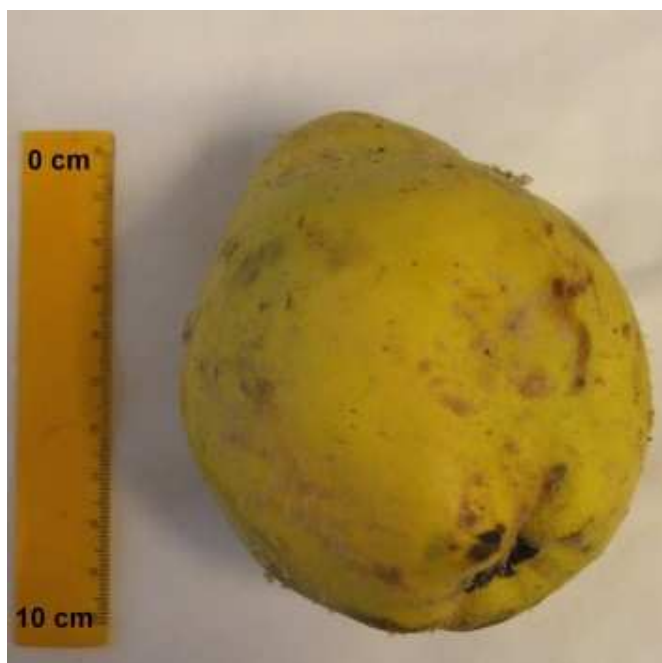
Váha analyzovaného plodu byla 286,11 g.



### **Ironda**

Má protáhle hruškovitý až citrónový tvar plodu, který váží průměrně 545,3 g. Slupka má zelenavě žlutou barvu a na sluneční straně má nahnědlé teky. Dužnina je žlutobílá, střední konzistence, aromatická a její chuť navinule sladká. [14]

Váha analyzovaného plodu byla 195,24 g.



### **Juranská**

Tvar plodu je vysoce kulovitý, žebnatý s vystouplými žebry porušujícími oblost plodu. Průměrná váha je 187,8 g. Pod nažloutlou, hladkou a téměř lysou slupkou se nachází žlutozelená tuhá dužnina kyselé chuti. [14]

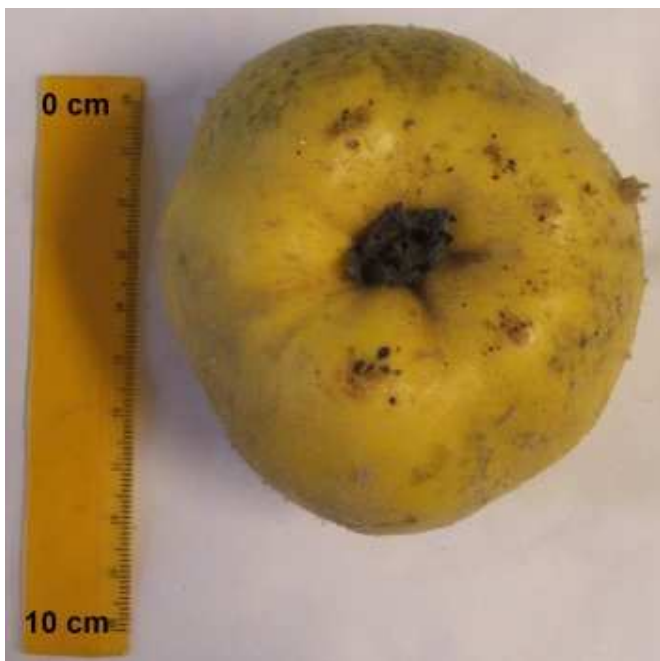
Váha analyzovaného plodu byla 89,13 g.



### **Leskovačka**

Plody jsou velké, hruškovitého tvaru. Slupka je zelenavě žluté barvy. Průměrná hmotnost plodů dosahuje 315 g. Dužnina je světle žluté barvy, šťavnatá. [14]

Váha analyzovaného plodu byla 220,77 g.



### **Mir**

Kulovitý tvar s protáhlou a vystouplou stopečnou částí mají plody odrůdy Mir, které váží 410,6 g. Jejich slupka je zelenavě žlutá, hladká, lesklá a jemně plstnatá. Dužnina má světle žlutou barvu, je šťavnatá a tuhá. Chuť plodu je navinule sladká. [14]

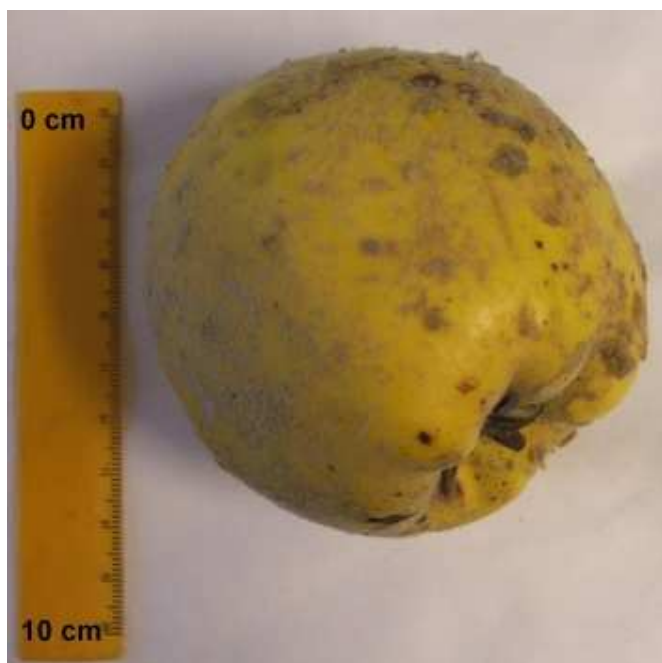
Váha analyzovaného plodu byla 274,73 g.



### **Muškatová**

Plody mají vysoce kulovitý, pravidelný tvar o hmotnosti 490,8 g. Slupka je žlutá, na povrchu jemně plstnatá a plst' pokrývá celý plod. Pod slupkou se nachází žlutozelená, tuhá a výrazně aromatická dužnina kyselé chuti. [14]

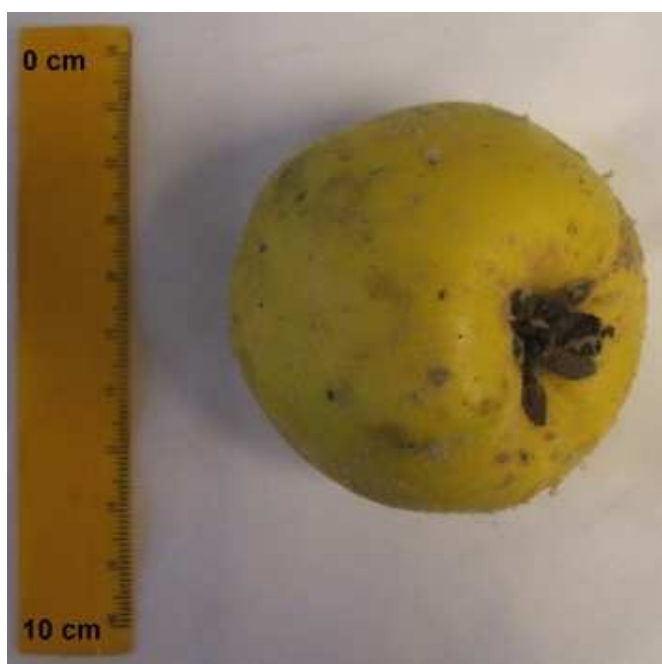
Váha analyzovaného plodu byla 215,08 g.



### **Pinter**

Mají vysoce kulovitý až válcovitý tvar s průměrnou hmotností 214,3 g. Slupka má zelenožlutou barvu, je matná a jemně hrbolatá. Dužnina je zelenožluté barvy, tuhé konzistence a sladce kyselé, navinulé chuti. [14]

Váha analyzovaného plodu byla 105,52 g.



## Selena

Váha analyzovaného plodu byla 121,89 g.



## Šuranská

Plody této odrůdy jsou ploše kulovité s vystouplou protáhlou stopečnou částí. Nepravidelnost plodu je zvýrazněna žebry. Průměrná váha se pohybuje okolo 324,8 g. Pod zelenavě žlutou, matnou, plstnatou a na sluneční straně tečkovanou slupkou se nachází kyselá aromatická dužnina žlutozelené barvy a tuhé ale šťavnaté konzistence. [14]

Váha analyzovaného plodu byla 99,43 g.

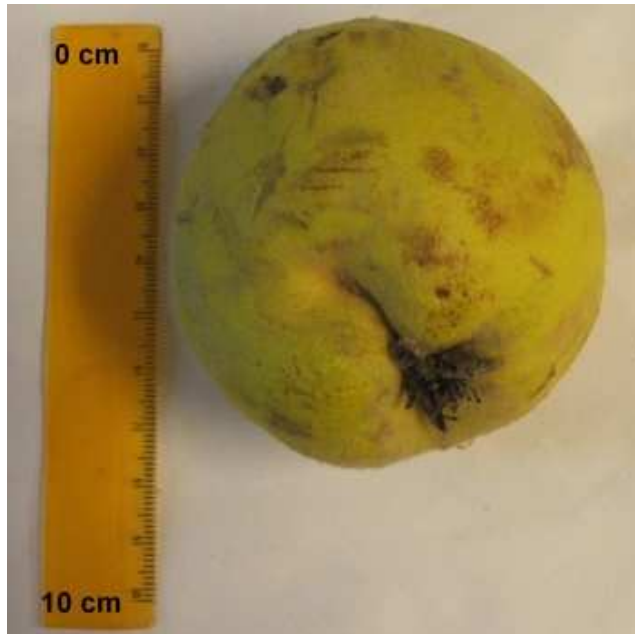




### **Triumph**

Vysoce kulovitý až hruškovitý tvar mají plody odrůdy Triumph. Průměrná hmotnost plodu je 596,7 g. Slupka má zelenavě žlutou barvu, která v oblasti žebér přechází v zelenou, jemně pruhovaná, mírně lesklá a na povrchu plstnatá. Dužnina má žlutozelenou barvu a šťavnatou a tuhou konzistenci. Chuť je sladce navinulá. [14]

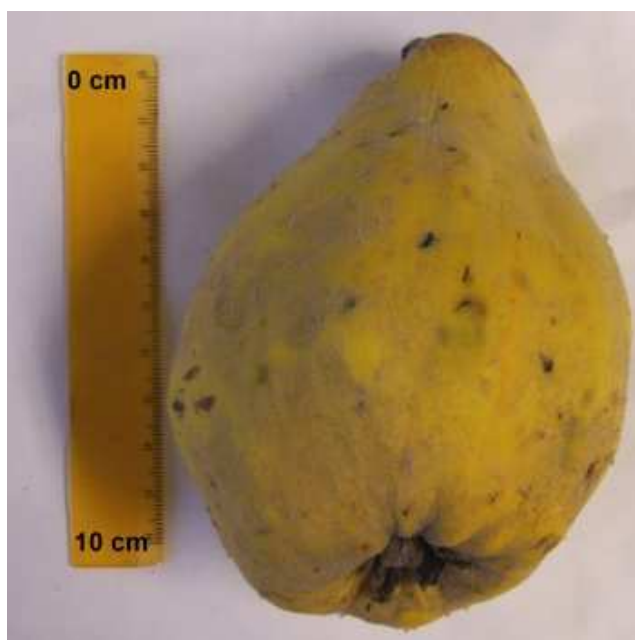
Váha analyzovaného plodu byla 159,46 g.



### **Vranja**

Plody jsou hruškovitého tvaru, mají sladkokyselou chuť s lehkým aroma. Průměrná hmotnost plodů je 420 g, ale může dosáhnout až k 1 kg. [11]

Váha analyzovaného plodu byla 329,47 g.



## **Příloha č. 2 – Vzorok plodů analyzovaných odrůd rakytníku – sběr podzim 2006**

Plody byly sbírány na podzim roku 2006 a poté uchovávány při -20 °C. Snímky byly pořízeny před měřením.

### **Buchlovice 1**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,71 g.



### **Kyjevský**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,54 g.



### **Leicora**

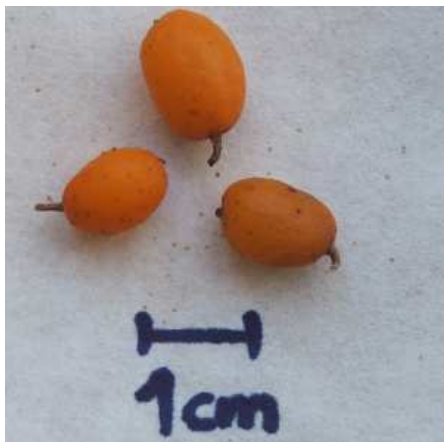
Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,46 g.





### **Ljubitelna**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,42 g.



### **Olejová**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,31 g.



### **Petěrburský**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,39 g.



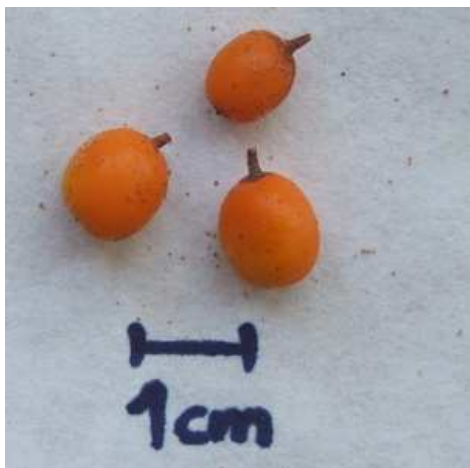
### **Velkoosecký 3**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,49 g.



### **Vitamínová**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,34 g.



### **Příloha č. 3 – Vzorky plodů analyzovaných odrůd rakytníku – sběr zima 2008**

Plody byly sbírány na konci prosince roku 2008. Byly uchovávány 2,5 měsíce při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , poté při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Snímky byly pořízeny před měřením.

#### **Leicora**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,67 g.



#### **Pavlovský**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,38 g.



### **Petěrbuský**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,55 g.



### **Velkoosecký**

Průměrná váha plodů pro analýzu je 0,62 g.



**Příloha č. 4: Přehled extrakčních technik pro stanovení vitamínu C v potravinách a biologických vzorcích**

stanovované látky	matrice	přístup světa	teplota	extrakční činidlo	stabilizační činidlo	reference, rok
AA, DHAA	zelené fazole	-	-	4,5% MPA	DTT	[37], 2000
AA, DHAA	různé potraviny	-	-	1% MPA		[42], 2007
AA, isoAA,	různé potraviny	-	-	1% TCA	TCEP	[51], 2006
AA, isoAA, DHAA, DhisAA	potraviny, biologické vzorky	tma	4 °C	1% MPA s 0,5% k. šťávelovou,		[38], 1999
AA, DHAA	tropické ovoce	tma	4 °C	3% MPA v 8% k. octové 0,1% kyselina šťávelová	testováno EDTA, TBHQ, BHT	[39], 2006
AA	šípky	zkoumáno	zkoumáno	5 % MPA		[40], 2008
AA, DHAA	ovoce	-	-	4,5% MPA	DTT	[52], 2007
AA, DHAA	plody rakytníku	-	-	voda	DTT	[53], 2004
AA	banán, papája	tma	4 °C	3% MPA v 8% k. octové	EDTA	[54], 2006
AA	hrušky	zkoumáno	zkoumáno	6% MPA		[34], 2002
AA, DHAA	potraviny	-	-	2% MPA		[1], 2004
AA	plody rakytníku	-	-	2% kyselina šťávelová		[50], 2007
AA	plody dřínu	-	-	2% MPA		[49], 2008
AA, DHAA	sérum	-	-	10% MPA	DTT, EDTA	[43], 2000
AA	nápoje	tma	4 °C	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH = 2,2		[55], 2002

**Příloha č. 5: Podmínky analýzy při stanovení vitamínu C v různých potravinách a biologických vzorcích.**

stanovované látky	matrice	kolona, stacionární fáze	mobilitní fáze	detekce	t <sub>R</sub> (min.)	validační data	reference, rok
AA, isoAA	různé potraviny	LiChrospher RP-18 250 x 4,6 mm; 5 µm	1,6 g decylaminu, 80 ml acetonitrilu, 100 ml CH <sub>3</sub> COONa o c = 0,25 M, 820 ml vody, pH = 5,4, 50 mg TCEP.HCl	UV λ = 245 nm	12,8	R = 0,9999 LOD = 0,1 µg ml <sup>-1</sup> LOQ = 0,3 µg ml <sup>-1</sup> RSD = 2-8 %	[51], 2006
AA	hrušky	Inertsil ODS-3 250 x 4,6 mm; 5 µm	0,02 M o-fosforečná kyselina 0,7 ml min <sup>-1</sup>	UV λ = 254 nm	-	-	[34], 2002
AA	šípky	Spherical RP C18 250 x 4,6 mm; 5 µm	0,5% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 2,25) acetonitril (93:7), 1,2 ml min <sup>-1</sup>	UV λ = 245 nm	6,15	R = 100 ± 4 %	[40], 2008
AA, DHAA	rakytník	LiChrospher RP-18 250 x 4 mm; 5 µm	0,5 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1 % DTT	UV (DAD) λ = 254 nm	-	-	[53], 2004
AA, DHAA	ovoce	RP C18 Spherisorb ODS2 250 x 4 mm; 5 µm	0,01 % kyselina sírová, pH = 2,6 1 ml min <sup>-1</sup>	UV λ = 245 nm	-	R = 0,994 LOD = 0,17 mg/100g LOQ = 0,57 mg/100g	[52], 2007
AA	banán, papája	C18-SepPaks 250 x 2,1 mm; 5 µm	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 2,14 0,25 ml min <sup>-1</sup>	UV (DAD) λ = 254 nm	-	LOD = 0,05 µg R = 97 % ± 11	[54], 2006
AA, DHAA	potraviny	LiChrospher RP-18 250 x 4 mm; 5 µm	13,6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : methanol (9:1) 0,7 ml min <sup>-1</sup>	UV λ = 265 nm	11,9	-	[1], 2004
AA	plody rakytníku	Tessek separon SGX 250 x 4 mm; 5 µm	0,01 M kyselina šťavelová 1 ml min <sup>-1</sup>	UV λ = 254 nm	3,5	R = 0,9885 R = 89,5 %	[50], 2007
AA	plody dřínu	Xterra RP C18 150 x 3 mm; 3,5 µm	13,6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : methanol (9:1) 0,25 ml min <sup>-1</sup>	UV λ = 258 nm	4,9	-	[49], 2008

**Příloha č. 5: Podmínky analýzy při stanovení vitamínu C v různých potravinách a biologických vzorcích (pokračování)**

stanovované látky	matrice	kolona, stacionární fáze	mobilitní fáze	detekce	tr (min)	validační data	reference, rok
AA, DHAA	zelené fazole	odkaz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH = 2,6	UV λ = 245 nm	4,8		[37], 2000
AA, DHAA	tropické ovoce	Shodex Rspak KC-811 250 x 4,6 mm; 5 μm	0,2% ortofosforečná kyselina průtok 1,2 ml.min <sup>-1</sup>	UV λ = 245 nm	6,1	R = 0,980 (MPA) R = 0,965 (k. štav.)	[39], 2006
AA, DHAA	ovoce	NH <sub>2</sub> Spherisorb S5 250 x 4 mm; 5 μm	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3,5 acetonitril 60:40	UV λ = 245 nm	-	R = 0,998 LOD = 0,10 mg/100g LOQ = 0,34 mg/100g	[52], 2007
AA	nápoje	Kromasil NH <sub>2</sub> 250 x 4,6 mm; 5 μm	0,1 M kyselina octová 1,5 ml.min <sup>-1</sup>	UV λ = 250 nm	9,3	R = 0,9997 LOD = 1,2 mg/l LOQ = 4,0 mg/l	[55], 2002
AA, DHAA	různé potraviny	Nova Pack C <sub>18</sub> 150 x 3,9 mm; 4 μm	fosfátový pufr (pH = 7,8) 16 % methanolu, průtok 0,8 ml.min <sup>-1</sup>	fluorescenční λ <sub>ex</sub> = 365 nm λ <sub>em</sub> = 425 nm	1,89	R = 0,9997 LOQ = 0,83 μg.ml <sup>-1</sup> LOL = 8,0 μg.ml <sup>-1</sup>	[42], 2007
AA, isoAA, DHAA, DHisoAA	potraviny, biologické materiály	Jupiter C <sub>18</sub> 250 x 4,6 mm; 5 μm	2,3 mM dodecyltrimethylamin chlorid a 2,5 mM Na <sub>2</sub> EDTA v 66 mM fosfáto-20 mM acetoátovém pufru, pH = 4,5 průtok 1,2 ml.min <sup>-1</sup>	fluorescenční λ <sub>ex</sub> = 350 nm λ <sub>em</sub> = 430 nm UV (AA) λ = 247 nm	6,5-8	R = 0,9999 RSD = 1,16	[38], 1999
AA, DHAA	sérum	Inertsil ODS-2 150 x 4 mm; 5 μm	30 mmol/l pH = 2,3 fosfátový pufr, EDTA, 0,7 ml.min <sup>-1</sup>	ECH (AMD) U = 600 mV	-	-	[43], 2000